

**Etablierung von Methoden
zur Bioevaluation
antitumoraler Naturstoffe,
Metabolite und Analoga**

Vorgelegt von
Sebastian Knauer
(Dipl.-Biol. Univ.)
aus Bayreuth

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

angefertigt am Lehrstuhl Organische Chemie I
der Universität Bayreuth

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2005 bis April 2011 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Schobert am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie / Chemie / Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	06. 12. 2011
Zulassung durch die Promotionskommission:	14. 12. 2011
Wissenschaftliches Kolloquium:	24. 04. 2011
Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Rainer Schobert (Erstgutachter)
Prof. Dr. Gerhard Rambold (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann
Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitz)

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Krebs und seine Eigenschaften	1
1.1.1	Allgemeine Informationen	1
1.1.2	Die Entstehung von Krebs und ihre Ursachen	4
1.1.3	Die Tumorentwicklung	6
1.1.4	Apoptose und Nekrose	12
1.2	Die Bekämpfung von Krebs und die Wirkung von Cytostatika	17
1.2.1	Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen	17
1.2.2	Cisplatin und andere bioaktive Metallkomplexe	18
1.2.3	Hormone als Cytostatika	22
1.2.4	Combretastatine	24
1.2.5	Stickstoff-Lost-Derivate	28
1.2.6	Illudine	31
1.3	Zielsetzung	34
2.	Materialien und Methoden	35
2.1	Verwendete Materialien	35
2.1.1	Geräte	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.3	Organismen	38
2.1.4	Chemikalien	38
2.1.5	Testsubstanzen	42
2.2	Optimierung der Produktion von Illudinen	57
2.2.1	Nachweis von Illudinen per HPLC	57
2.2.2	Bestimmung der optimalen Aufzuchtbedingungen für die Illudinproduktion	59
2.2.3	Entwicklung der optimalen Extraktionsmethode	64
2.2.3.1	Extraktion mit Essigsäureethylester und Chloroform	65
2.2.3.2	Extraktion nach Kutscher-Steudel	65
2.2.3.3	Gewinnung von Illudin M unter Verwendung von Amberlite® XAD 16	66
2.3	Gewinnung von Illudin M im Grammmaßstab	68

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Aufzucht	68
2.3.2	Gewinnung des Rohextrakts	70
2.3.3	Aufreinigung von Illudin M	71
2.3.4	Aufreinigung von Illudin S	71
2.4	Stabilitätsuntersuchungen an Estern	72
2.4.1	Tests an (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexen per HPLC	72
2.4.2	Tests an Rutheniumkomplexkonjugaten via Absorptionsmessung	73
2.5	Untersuchung der Bildung von Metallkomplexen	75
2.5.1	Durchführung	75
2.5.2	Auswertung	76
2.6	Das Glutathion-Monitoring	78
2.6.1	Durchführung	78
2.6.2	Auswertung	79
2.7	Alkylierungsassays	81
2.7.1	Durchführung des Alkylierungsassays mit Aceton	83
2.7.2	Durchführung des Alkylierungsassays mit Acetophenon	85
2.8	Zellkultur	86
2.8.1	Kultivierung der Suspensionskulturzellen HL 60	88
2.8.2	Kultivierung der adhärenenten Zellen 518 A2	90
2.8.3	Kultivierung der adhärenenten Zellen KB-V1	91
2.8.4	Kultivierung der adhärenenten Zellen MCF-7	91
2.8.5	Kultivierung der adhärenenten Zellen HT-29	91
2.8.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	92
2.9	Der TUNEL-Test	93
2.9.1	Der TUNEL-Test mit HL 60-Zellen	94
2.9.2	Eine Variante des TUNEL-Tests mit HL 60-Zellen	95
2.9.3	Der TUNEL-Test mit adhärenenten Zellen	95
2.10	Der Annexin-Test	97
2.10.1	Der Annexin-Test mit HL 60-Zellen	99
2.10.2	Der Annexin-Test mit 518 A2-Zellen	100
2.10.2.1	Der Annexin-Test mit trypsinisierten Zellen	100
2.10.2.2	Der Annexin-Test mit Collagen-beschichteten Objektträgern	100
2.10.2.3	Der Annexin-Test mit Chamber Slides	101
2.10.2.4	Der Annexin-Test mit Mikrotiterplatten	102

2.11	Der Immunoblot	103
2.11.1	Testansatz und Proteingewinnung	103
2.11.1.1	Gewinnung des Zellproteins von HL 60-Zellen	103
2.11.1.2	Gewinnung des Zellproteins von adhärenenten Zellen	104
2.11.1.3	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	104
2.11.2	Herstellung der PAGE-Gele	105
2.11.3	Aufragen der Proben und Elektrophorese	107
2.11.4	Färben der Gele	108
2.11.5	Western Blot	109
2.11.6	Färben der PVDF-Membranen	110
2.11.7	Immunoreaktion gegen Caspase 9	111
2.12	Der CAM-Assay	112
2.12.1	Präparation der Eier und Aufzucht der Embryonen	112
2.12.2	Alternative Aufzuchtmethoden	114
2.12.2.1	Petrischalen	114
2.12.2.2	Glasschalen	114
2.12.2.3	Plastikbecher	114
2.12.3	Test der Substanzen	115
2.12.3.1	Applikation mit Silikonring	115
2.12.3.2	Applikation über Plättchen	115
2.12.3.3	Direkte Applikation	115
2.12.4	Dokumentation	116
3.	Ergebnisse	117
3.1	Optimierung der Methode zur Gewinnung von Illudinen	117
3.1.1	Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für die Illudin-Produktion	117
3.1.1.1	Illudin M	117
3.1.1.2	Illudin S	121
3.1.2	Ermittlung der optimalen Extraktionsmethode für Illudine	125
3.1.2.1	Ausschütteln	125
3.1.2.2	Extraktion nach Kutscher-Steudel	128
3.1.3	Gewinnung von Illudinen unter Verwendung von XAD16	130
3.2	Stabilitätsuntersuchungen an Estern	132
3.2.1	Tests an Platinkomplexkonjugaten per HPLC	132

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Tests an Rutheniumkomplexen via Absorptionsmessung	134
3.3	Bestimmung von Komplexbildungskonstanten	136
3.3.1	Untersuchung von Fe-(III)-Komplexen	136
3.3.2	Untersuchung von weiteren Metallkomplexen	139
3.4	Glutathion-Monitoring	141
3.5	Vergleich des Alkylierungspotentials	143
3.5.1	Der Alkylierungsassay mit Aceton	143
3.5.1.1	Lösungsmittelleffekte	143
3.5.1.2	Einfluß der Inkubationszeit	144
3.5.1.3	Test von Illudinderivaten	145
3.5.2	Der Alkylierungsassay mit Acetophenon	147
3.6	Der TUNEL-Test	148
3.6.1	Methodenentwicklung für den TUNEL-Test mit HL 60-Zellen	148
3.6.2	Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den HL 60-Zellen	149
3.6.3	Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den 518 A2-Zellen	155
3.6.4	Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den Kb-V1-Zellen	158
3.6.5	Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den MCF-7-Zellen	159
3.6.6	Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den HT 29-Zellen	160
3.6.7	Der TUNEL-Test mit einer Substanzkonzentration entsprechend dem IC ₅₀ -Wert	162
3.7	Der Annexin-V-Fluos-Test	163
3.7.1	Der Annexin-Test an den HL 60-Zellen mit einer Inkubationszeit von 6 h	163
3.7.2	Abhängigkeit des Annexin-Tests von der Inkubationszeit	169
3.7.3	Der Annexin-Test an den 518 A2-Zellen	174
3.7.3.1	Vorsichtiges Trypsinieren der Zellen	174
3.7.3.2	Verwendung collagenbeschichteter Objektträger	175
3.7.3.3	Verwendung von Chamber-Slides und Mikrotiterplatten	176
3.8	Immunoblot	180
3.8.1	Methodenentwicklung	180
3.8.1.1	Bestimmung der optimalen PAGE-Bedingungen	180
3.8.1.2	Bestimmung der optimalen Bedingungen zur Immunodetektion	182
3.8.2	Untersuchung der Caspase 9-Aktivierung mittels Immunoblot	183
3.8.2.1	Untersuchungen an HL 60-Zellen	183

3.8.2.2	Untersuchungen an 518 A2-Zellen	187
3.8.2.3	Untersuchungen an Kb-V1-Zellen	189
3.9	Der CAM-Assay	190
3.9.1	Vergleich verschiedener Aufzuchtmethoden	190
3.9.1.1	Petrischalen	191
3.9.1.2	Glasschalen	192
3.9.1.3	Plastikbecher	192
3.9.2	Vergleich verschiedener Auftragungsmethoden	192
3.9.2.1	Applikation mit Silikonring	192
3.9.2.2	Applikation über Plättchen	194
3.9.2.3	Direkte Applikation	195
3.9.3	Wirkung verschiedener Substanzen im CAM-Assay	196
4.	Diskussion	201
4.1	Gewinnung von Illudin M und S	201
4.1.1	Nachweis von Illudin M und S	201
4.1.2	Gewinnung von Illudin M	201
4.1.3	Gewinnung von Illudin S	202
4.1.4	Gewinnung von Illudin M unter Einsatz von XAD 16	202
4.1.5	Zusammenfassung und Problemdiskussion	203
4.2	Stabilitätsuntersuchungen	204
4.2.1	Substanzuntersuchungen per HPLC	204
4.2.2	Zusammenfassung und Problemdiskussion der HPLC-Methode	204
4.2.3	Spektrometrische Substanzuntersuchungen	205
4.2.4	Problemdiskussion und Vergleich der beiden Methoden	205
4.3	Komplexbildung	206
4.3.1	Untersuchung von Eisenkomplexen	206
4.3.2	Untersuchung weiterer Metallkomplexe	206
4.3.3	Zusammenfassung und Problemdiskussion	207
4.4	Glutathion-Monitoring	208
4.4.1	Untersuchung von Illudinderivaten	208
4.4.2	Zusammenfassung und Problemdiskussion	209
4.5	Vergleich des Alkylierungspotentials	210
4.5.1	Einfluss des Lösungsmittels	210
4.5.2	Einfluss der Inkubationszeit	210

Inhaltsverzeichnis

4.5.3	Zusammenfassung und Problemdiskussion der Methode mit Aceton	211
4.5.4	Diskussion der alternativen Untersuchungsmethode mit Acetophenon	211
4.6	Der TUNEL-Test	212
4.6.1	Methodenentwicklung	212
4.6.2	Untersuchung der Testsubstanzen	212
4.6.3	Zusammenfassung und Problemdiskussion	213
4.7	Der Annexin-Test	214
4.7.1	Zusammenfassung und Problemdiskussion im Vergleich mit dem TUNEL-Test	214
4.7.2	Problemdiskussion der Untersuchung adhärenter Zellen	215
4.8	Der Immunoblot	216
4.8.1	Methodenentwicklung	216
4.8.2	Untersuchungen an den HL 60-Zellen	217
4.8.3	Untersuchungen an den 518 A2-Zellen	217
4.8.4	Untersuchungen an den Kb-V1-Zellen	218
4.8.5	Zusammenfassung und Problemdiskussion	218
4.9	Der CAM-Assay	219
4.9.1	Aufzucht der Embryonen	219
4.9.2	Applikation der Testsubstanzen	220
4.9.3	Untersuchung der Testsubstanzen	220
4.9.4	Zusammenfassung und Problemdiskussion	222
4.10	Zusammenfassung	223
4.11	Summary	225
5.	Literatur	227
6.	Publikationsliste	241
	Danksagung	242
	Erklärung	244

Abkürzungsverzeichnis

<i>a</i>	Abbaurate
Abb.	Abbildung
<i>Abs</i>	Absorption
<i>Abs_{max}</i>	maximale Absorption
Acrylamid/bis	Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid
ad.	hinzufügen bis zum angegebenen Volumen
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i> oder auch <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AOR	NADPH-abhängige Alkenal/on Oxidoreduktase
Apaf-1	<i>antiapoptotic factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AP-T	abgeleitet von alkalische Phosphatase und Tween
<i>Aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>absorption units</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bit	<i>binary digit</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>c</i>	Konzentration
ca.	<i>circa</i>
Cadherine	<i>calcium adhering protein</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CAM-Assay	<i>chorioallantoic membrane-assay</i>
Caspase	cysteinabhängige, aspartatspezifische Protease
CDM-Medium	Czapek-Dox-Mineral Solution-Modified
Ctr1P	<i>copper transporter 1 protein</i>
CysLT ₁	<i>cysteinyl leukotriene receptor 1</i>
DAP	2,3-Diaminoproansäure
DC	Dünnschichtchromatographie

Abkürzungsverzeichnis

DD	Todesdomäne (engl.: <i>Death Domain</i>)
d.h.	das heißt
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
et al.	<i>et alii</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas	Fettsäure-Synthase
FasL	Fas-Ligand
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GCMS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
GCSL-Medium	<i>Glucose-Corn-steep liquor</i>
GSH	Glutathion
G ₀ -Phase, G ₁ -Phase	abgeleitet von Lücke (engl.: <i>gap</i>)
HA-Medium	Medium nach H. Anke
HA-	HA-Medium ohne Valin
HA+	HA-Medium mit Valin
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>K_D</i>	spezifische Bindungskonstante
<i>K_{EDTA}</i>	spezifische Bindungskonstante von EDTA-Komplexes

Lost	Senfgas und seine Derivate, abgeleitet von Wilhelm Lommel und Wilhelm Steinkamp
ln	natürlicher Logarithmus
$M(EDTA)$	Komplex des Kations mit EDTA
$M(L)$	Komplex des Kations mit der Testsubstanz
$[M(EDTA)]$	Konzentrationen des Komplexes des Kations mit EDTA.
$[M(L)_n]$	Konzentrationen des Komplexes des Kations mit der Testsubstanz
MS	Massenspektrometrie
MSP-Medium	Malzextrakt-Sojapepton-Medium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Zahl der Liganden
NAD^+	Nicotin(säure)amid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von NAD^+
$NADP^+$	Nicotin(säure)amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von $NADP^+$
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Nu	Nukleophil
P	prozentualer Anteil an Molekülen mit nichtreduzierter Doppelbindung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pdf	<i>portable document format</i>
Pgp	P-glycoprotein
pH	<i>pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p53	Protein, abgeleitet von der molekularen Masse in der SDS-PAGE
R_f	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i>
R^2	Regression

Abkürzungsverzeichnis

SGSMØ-Medium	Sojapepton-Glucose-Stärke-Medium ohne CaCO_3
SDS	Sodiumdodecylsulfat
$\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion	nukleophile bimolekulare Substitutionsreaktion
S-Phase	Synthesephase
Stabw.	Standardabweichung
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCR	Transcription Coupled Repair
TdT	Terminale Transferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
tif	<i>tagged image file format</i>
<i>TP53</i>	Gen zu p53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i>
UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
vis	sichtbarer Bereich des Lichts (abgeleitet von <i>visible</i>)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel
Δ	Unterschied/Differenz
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1 Krebs und seine Eigenschaften

1.1.1 Allgemeine Informationen

Einer aktuellen Schätzung zufolge erwartet man für das Jahr 2010 rund 450.000 neue Krebserkrankungen in Deutschland. Und auch wenn man bei der Zahl der Neuerkrankungen (Inzidenz) sowie bei der Sterblichkeitsrate (Mortalität) dank der medizinischen Fortschritte in den letzten Jahren einen Rückgang verzeichnen kann, bleibt Krebs eines der bedrohlichsten Leiden in unserer Gesellschaft (siehe Abb. 1.1). So verstarben im Jahr 2006 mehr als 200.000 Patienten daran, womit die verschiedenen Formen dieser Krankheit neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen Rang zwei der häufigsten Todesursachen einnehmen. Aus diesem Grund ist und bleibt die Krebsforschung weiterhin von entscheidender Bedeutung.^[1, 2]

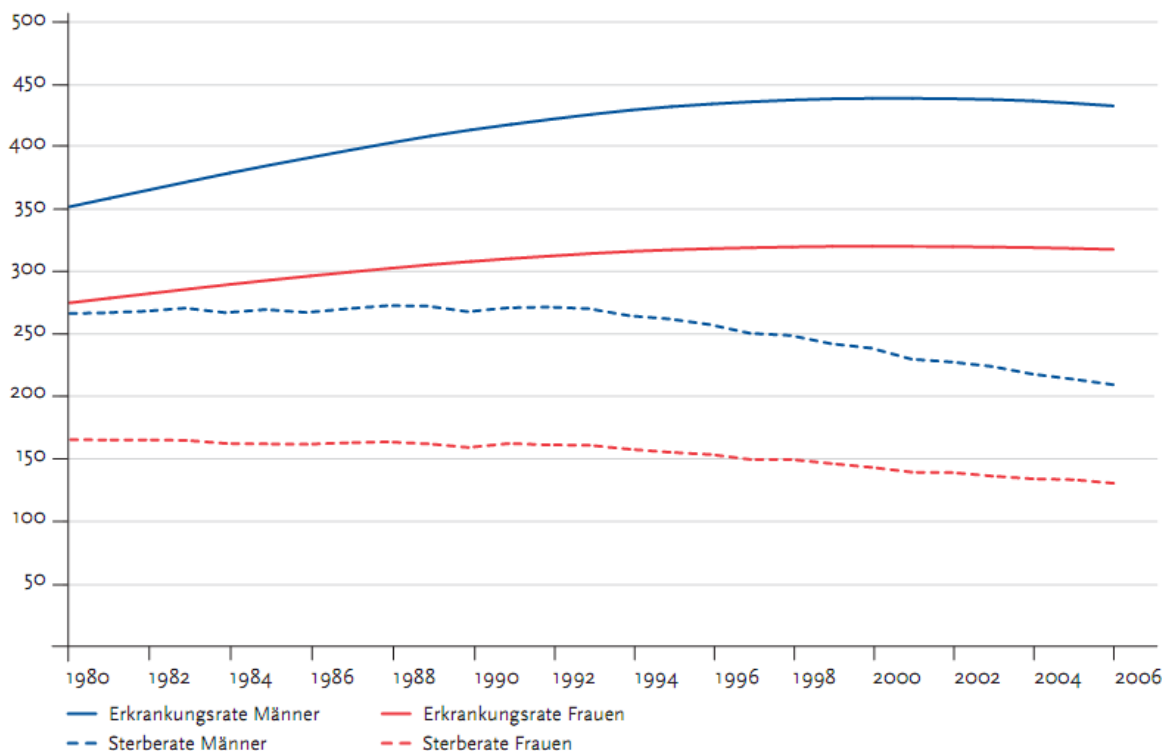


Abbildung 1.1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland

Angegeben ist jeweils die Zahl der Krebsneuerkrankungen bzw. Sterbefälle pro 100.000, aufgetragen für die Jahre 1980 bis 2006 und getrennt nach Geschlecht. Bild aus^[2]

Einleitung

Krebs ist ein Sammelbegriff, der verschiedene Krankheitsbilder umfasst. Die Bezeichnung leitet sich aufgrund der äußerlichen Ähnlichkeit von dem Tier gleichen Namens ab. Galenos von Pergamon lebte im 2. Jahrhundert v. Chr. und war der erste, der den Begriff, der wahrscheinlich auf Hippokrates zurückzuführen ist, schriftlich festhielt.^[3] Heutzutage wird er für alle Erkrankungen angewendet, denen ein unkontrolliertes und schädliches Wachstum von Gewebe zu Grunde liegt. Als Tumor bezeichnet man gemäß Definition jegliche Raumforderung im Körper. Er setzt sich aus den eigentlichen Tumorzellen, dem Tumorphenchym, und einem stützenden Bindegewebe, dem Stroma zusammen. Letzteres kann auch Blutgefäße enthalten.^[4] Man muss zwischen einem bösartigen oder malignen Tumor und einem gutartigen oder benignen unterscheiden. Das wichtigste Merkmal eines gutartigen Tumors ist, dass er nicht in das umliegende Gewebe vordringt und infolgedessen auch keine Tochtergeschwülste bildet. In manchen Fällen kann es auch zur Ausbildung einer Kapsel kommen, die den benignen Tumor umschließt, so dass man eine genaue Grenze zwischen ihm und dem umgebenden Gewebe erkennen kann. Diese ermöglicht eine meist relativ problemlose Entfernung. Dennoch ist nicht jeder benigne Tumor prinzipiell harmlos, denn es handelt sich auch hierbei um eine Vergrößerung von Gewebe, die sich in ihrer Umgebung bemerkbar machen kann.^[1, 4 - 6]

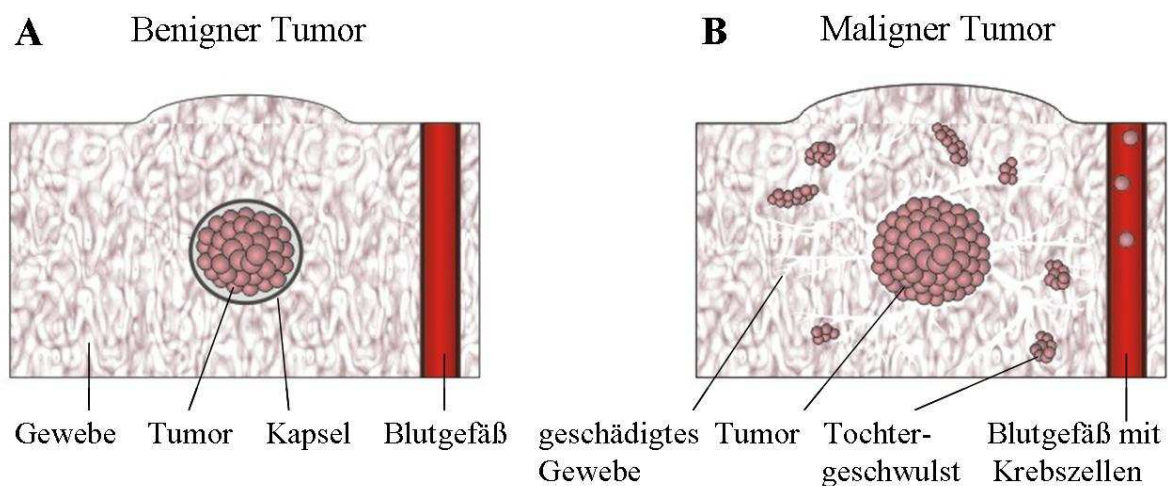


Abbildung 1.2: Vergleich zwischen benignem und malignem Tumor

Teilbild A zeigt einen gutartigen Tumor in fortgeschrittenem Entwicklungsstadium. Er verdrängt das umliegende Gewebe und bildet in diesem Beispiel eine Kapsel aus. In Teilbild B ist ein bösartiger Tumor zu erkennen, der Tochtergeschwülste ausgebildet und das umliegende Bindegewebe geschädigt hat. Zellen gelangen auch in die Blutbahn und metastasieren. Bild nach ^[6]

Maligne Tumore wachsen schnell und mit einer hohen Mutationsrate. Sie können im Unterschied zu den benignen in anderes Gewebe eindringen. Man spricht hierbei von invasivem Wachstum.^[1, 4, 5, 7, 8] In Abb. 1.2 ist der Unterschied zwischen einem benignen und einem malignen Tumor dargestellt. Krebs ist jedoch nicht allein mit einem malignen Tumor gleichzusetzen, da daneben auch Hämoblastosen zu diesem Krankheitsbild gezählt werden. Hierbei kommt es zu einer schädlichen Vermehrung der Blutzellen oder ihrer Stammzellen. Man unterteilt sie in Lymphome und Leukämien.^[4, 9, 10] Die Verteilung der einzelnen Tumorarten und die Wahrscheinlichkeit daran zu erkranken ist nicht überall gleich. Es gibt sowohl geographische als auch geschlechtsspezifische Unterschiede. Zur Verdeutlichung sind in Abb. 1.3 nach Geschlecht getrennte Aufstellungen zur Häufigkeit einzelner Krebserkrankungen aufgeführt.^[2]

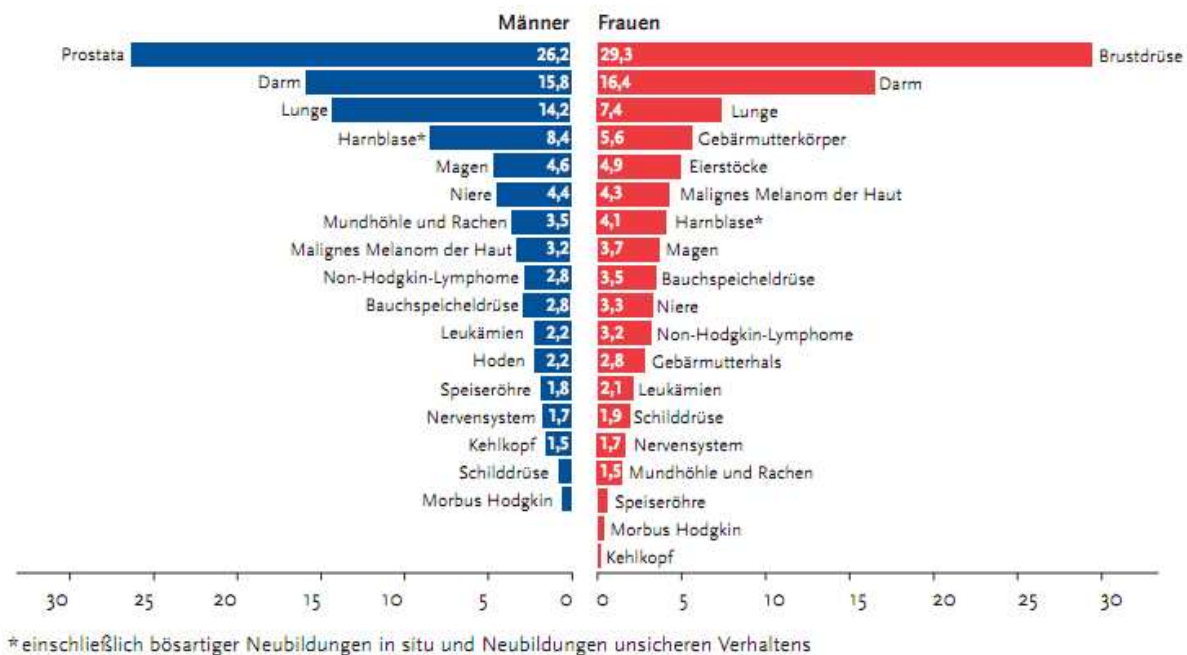


Abbildung 1.3: geschlechtsspezifischer Vergleich der Häufigkeit einzelner Tumorerkrankungen

Angegeben ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Krebsart bezogen auf die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2006 in ganz Deutschland. Das Diagramm ist aufgetrennt nach Geschlechtern. Bild aus ^[2]

1.1.2 Die Entstehung von Krebs und ihre Ursachen

Der gängigste Erklärungsansatz sieht als Ursprung der Tumorgenese eine Reihe genetischer Mutationen an, an deren Spitze eine in einem so genannten Wächtergen steht. Diese Gene sorgen in gesunden Körperzellen dafür, dass die Mutationsrate relativ gering bleibt und nur korrekte Erbinformationen an die Tochterzellen weitergegeben werden. Das wohl wichtigste Wächtergen ist *TP53*. Wird ein Schaden an der DNA registriert, bewirkt das von ihm kodierte Protein p53 ein Anhalten des Zellzyklus. Daraufhin kann entweder ein Reparaturmechanismus aktiviert und der Zellzyklus nach der Behebung des Schadens fortgesetzt werden, oder es wird der Tod der Zelle durch Apoptose eingeleitet. Weist p53 nun eine Mutation auf, die diese Kontrollfunktion beeinträchtigt, wird keine Unterbrechung des Zellzyklus mehr veranlasst und Fehler werden ohne Korrektur an die Tochterzellen weitergegeben. So können sich in den nachfolgenden Zellgenerationen immer mehr Mutationen ansammeln, was schließlich zu einer Entartung führt.^[11 - 14] Man geht davon aus, dass insgesamt sechs Veränderungen notwendig sind, um eine normale Körperzelle so zu transformieren, dass eine maligne Krebszelle entsteht. Diese dadurch erworbenen Eigenschaften umfassen die Zellteilung ohne äußeres Signal und trotz Stoppsignal, sowie die potentielle Unsterblichkeit, d.h. dass die Zahl der möglichen Zellteilungen unbegrenzt erhöht wird. Es findet eine Inaktivierung der Apoptose statt und es werden die Fähigkeiten zur Angiogeneseinduktion sowie zur Invasion und Metastasierung ausgebildet.^[14, 15] Die bei der Krebsentstehung betroffenen Gene unterteilt man in Oncogene und Tumorsuppressorgene. Bei Oncogenen wird infolge einer Mutation eine Überproduktion angeregt oder es wird ein fehlerhaftes Produkt synthetisiert. Die Tumorsuppressorgene sind im Normalzustand dafür verantwortlich, einer Krebsentwicklung entgegenzuwirken, werden im Falle der Tumorgenese allerdings inaktiviert.^[12] Die Mutationen, die zur Entartung einer Zelle führen, können viele Ursachen haben. So kann es auch im gesunden Körper durch Fehler bei der Replikation oder der Umwandlung einer Base zu spontanen Mutationen kommen. Diese treten zwar relativ selten auf, doch mit der Zeit sammeln sie sich an und wenn eine ausreichende Zahl vorliegt, kommt es zum Ausbruch der Krankheit. Deshalb ist es auch nachvollziehbar, warum Krebserkrankungen besonders häufig im fortgeschrittenen Alter auftreten. Neben den spontanen Mutationen gibt es aber auch die induzierten, die durch den Einfluss verschiedenartiger Mutagene wie Alkylanzien oder Interkalatoren verursacht werden (z.B. Senfgas oder Ethidiumbromid).^[12] Auch energiereiche Strahlen, wie Radioaktivität oder UV-Licht, sowie biotische Faktoren wie Viren und Transposons kommen hierfür in Betracht. So

erklärt sich auch die unterschiedliche Verteilung von Krebserkrankungen durch die unterschiedliche Exposition gegenüber Karzinogenen. So geht man davon aus, dass Rauchen eine der Hauptursachen von Lungenkrebs darstellt. Aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten kam es in den letzten Jahren zu einem Angleichen der Häufigkeit dieser Krebsart bei Männern und Frauen (vgl. Abb. 1.3).^[2, 12, 16]

Neben dem beschriebenen existiert noch ein weiterer Erklärungsansatz zur Tumorentstehung. Hierbei geht man davon aus, dass genetische Mutationen allein nicht ausreichen um die beobachteten Veränderungen zu erklären und die Ursache vielmehr auf chromosomaler Ebene zu suchen ist. Durch Chromosomenaberrationen kommt es zur Veränderung einer ganzen Reihe von Genen, wodurch deren Balance gestört wird. Der Entartung liegt laut dieser Theorie also nicht ein einfaches Ein- bzw. Ausschalten von Genen zu Grunde, sondern vielmehr ein Fehler bei ihrer Regulierung. Auch bei diesen chromosomalen Veränderungen kommt es bei den nachfolgenden Zellteilungen zu einer Anhäufung und somit zu einem schnellen Fortschreiten der Mutationen.^[12, 15, 17]

1.1.3 Die Tumorentwicklung

Ein Tumor kann sich aus einer einzelnen Stammzelle heraus entwickeln. Man geht davon aus, dass es sich dabei meist um eine zumindest potentiell teilungsfähige Zelle handelt, die jedoch vor der Transformation nur eine geringe Proliferationsrate aufweist. Durch unkontrollierte Teilungen entsteht aus ihr eine Ansammlung gleichartiger Zellen, weshalb man in diesem Stadium auch vom „klonalen Wachstum“ spricht. Aufgrund der den Krebszellen inhärenten genetischen Instabilität und durch Differenzierung analog zum Muttergewebe kommt es zur Bildung verschiedener Subklone. Bedingt durch den hohen Selektionsdruck können diese eine höhere Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel, Resistenzen gegen Cytostatika oder eine gesteigerte Invasivität entwickeln. Das vorliegende avaskuläre Tumorknötchen kann eine maximale Ausdehnung von 2 bis 3 mm³ erreichen, da bis zu dieser Größe noch eine Versorgung über Diffusion möglich ist. Weiteres Wachstum setzt eine aktive Versorgung über neu gebildete Blutgefäße voraus (siehe Abb. 1.4).^[1, 4, 18]

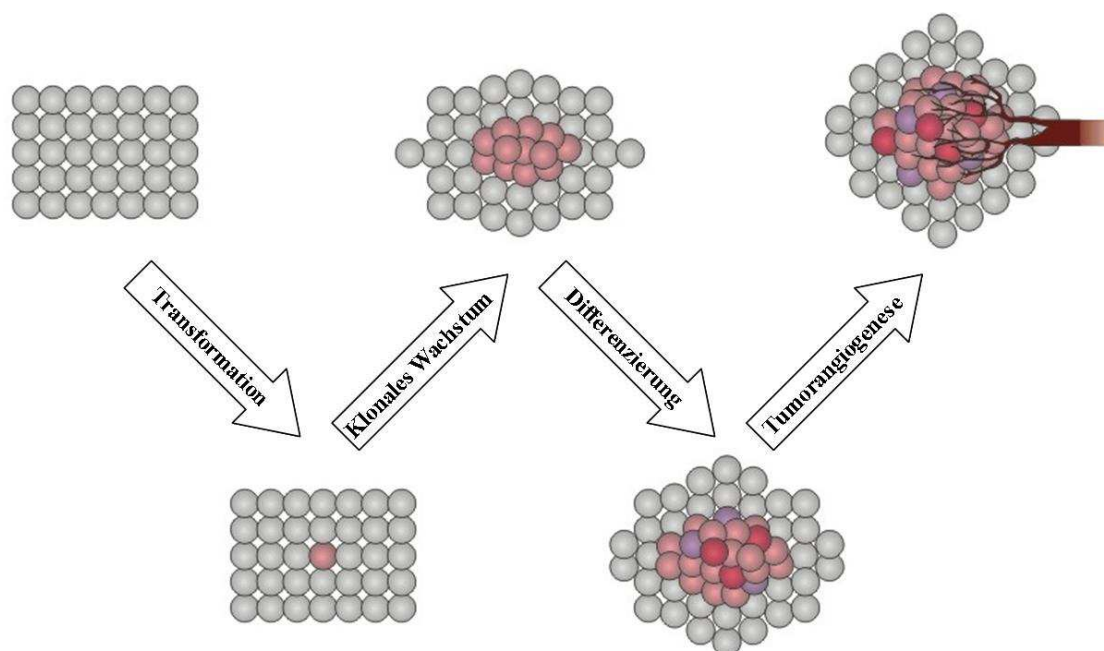


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Tumorentwicklung

Bei der Transformation wird aus einer gesunden Zelle (grau) eine Tumorstammzelle (rosa), die sich durch klonales Wachstum vermehrt. Später erfolgt eine Differenzierung der Krebszellen im avaskulären Tumorknötchen. Ab einer Größe von 2 bis 3 mm³ ist erst nach Einleitung der Tumorangiogenese ein weiteres Wachstum möglich. Bild nach ^[4]

Die als Angiogenese bezeichnete Neubildung von Blutgefäßen ist ein während der Embryonalentwicklung erwünschter Vorgang. Im adulten Organismus ist er allerdings kaum zu beobachten, da sich die aktivierenden und inhibierenden Botenstoffe im Gleichgewicht befinden. Sie tritt aber bei der Tumorentwicklung auf.^[14, 18 - 22] Die Induktion erfolgt hierbei, indem der Tumor Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF oder bFGF abgibt, die von den Rezeptoren in der Nähe befindlicher Blutgefäße registriert werden. Über eine nachfolgende Signalkaskade wird die Proliferation der Endothelzellen dieser Gefäße angeregt.^[14, 18 - 24] Die molekularen Ursachen für die Freisetzung der Wachstumsfaktoren sind noch nicht vollständig geklärt, aber man geht davon aus, dass die ursächlichen Mutationen regulatorische Proteine betreffen und nicht die eigentlichen Signalmoleküle.^[14] Die aktivierten Endothelzellen beginnen nun sich zu teilen und geben Matrixmetalloproteasen ins umliegende Gewebe ab. Deren Aufgabe ist es, die extrazelluläre Matrix zu zerstören, um so Platz für die neuen Gefäße zu schaffen.^[14, 18 - 22, 24] Die Zellen wandern nun in Richtung des ankommenden Signals und verbinden den Tumor unter Beteiligung von Integrinen mit dem bestehenden Gefäßsystem (siehe Abb. 1.5).^[18, 19, 21 - 25] Aufgrund der essentiellen Rolle der Tumorangiogenese für das Tumorstadium, wird in der medizinischen Forschung intensiv nach Substanzen gesucht, die diese hemmen können. Man unterscheidet hierbei zwischen antiangiogenen Verbindungen, die die Bildung neuer Blutgefäße verhindern und antivaskulären, die bereits bestehende angreifen. Die zu diesem Zweck eingesetzten Wirkstoffe nutzen dabei vier mögliche Angriffspunkte: Sie inhibieren die angiogeneseinduzierenden Wachstumsfaktoren bzw. das von ihnen verursachte Signal, hemmen die Matrixmetalloproteasen, greifen die Endothelzellen an oder agieren als Integrinantagonisten.^[18 - 22, 25 - 27]

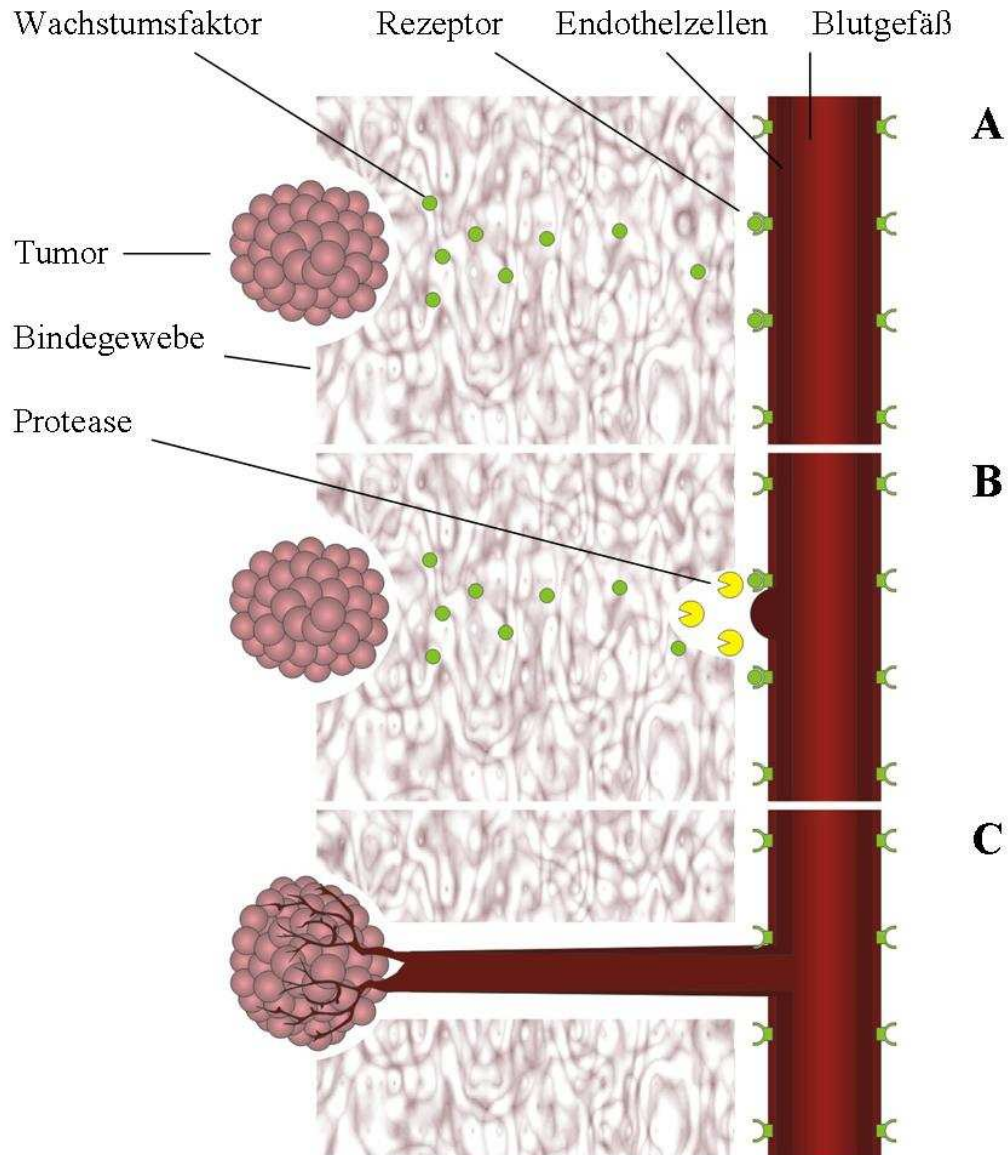


Abbildung 1.5: Tumorangio-genese

Teilbild A zeigt einen Tumor, der Wachstumsfaktoren abgibt, die von den Rezeptoren eines Blutgefäßes erkannt werden. In Teilbild B ist zu sehen, wie daraufhin Matrixmetalloproteasen ausgeschüttet werden, die das Bindegewebe zerstören. In Teilbild C ist dargestellt, wie die Endothelzellen eine Gefäßverzweigung bilden, die den Tumor schließlich versorgt und so ein weiteres Wachstum ermöglicht. Bild nach ^[23]

Einen voll entwickelten Tumor kann man in mehrere Bereiche unterteilen. Im Randbereich befinden sich Zellen, die den Verband verlassen und in fremdes Gewebe eindringen können, gefolgt von einer Schicht, die von Blutgefäßen gut versorgt wird und in der sich die Zellen rasch vermehren. Je näher man dem Kern des Tumors kommt, desto schlechter ist diese Versorgung, was dazu führt, dass man im Zentrum nur noch nekrotisch absterbende Zellen auffindet (siehe Abb. 1.6).^[22, 28]

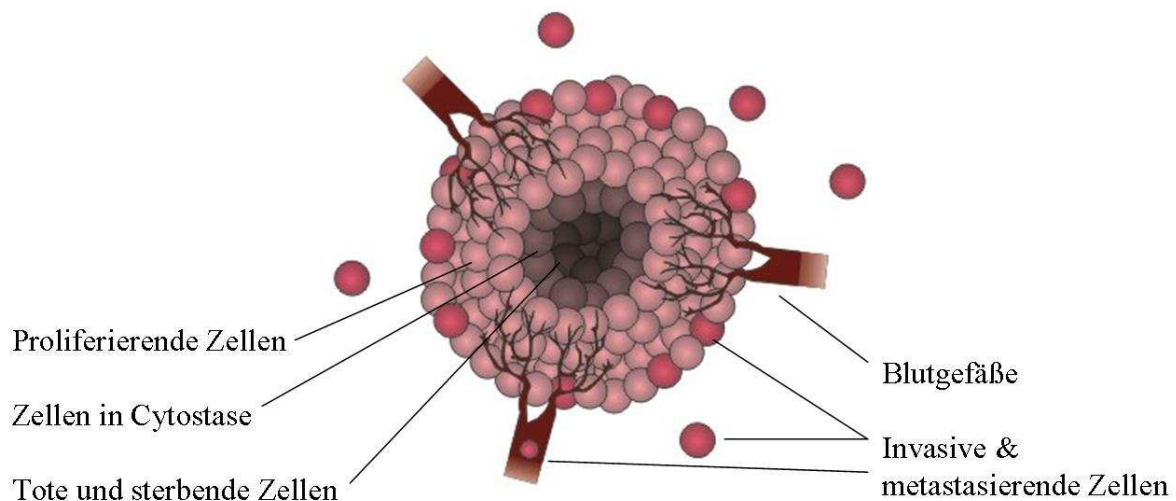


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau eines soliden Tumors

Am Rand befinden sich die Zellen, die für Invasion und Metastasierung verantwortlich sind. Es folgt ein mit Blutgefäßen durchzogener Bereich, in dem die Zellproliferation am stärksten ist. Im nekrotischen Zentrum bewirkt die nachlassende Versorgung ein Absterben der Zellen. Im Übergangsbereich befinden sich die Zellen in Cytostase. Bild nach ^[28]

Das wohl wichtigste Kennzeichen für einen malignen Tumor ist seine Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Als Invasion bezeichnet man das Eindringen in fremdes Gewebe, als Metastasierung die Ausbildung von Tochtergeschwüren an einer anderen Stelle im Körper. Damit ein Krebsgeschwür fremdes Gewebe infiltrieren kann, ist es notwendig, dass die Zell-Zell-Kontakte im Tumorgewebe aufgelöst werden. Dies erfolgt meist über einen Verlust der Bindungsfähigkeit der Cadherine. Ursächlich hierfür können z.B. eine Fehlregulation bei der Transkription oder ein proteolytischer Abbau dieser Proteine sein.^[4, 14, 29 - 31] Zum Eindringen muss außerdem das Bindegewebe abgebaut werden, das diesen Vorgang behindern würde. Diese Aufgabe übernimmt die Kollagenase IV. Registriert eine invasive Tumorzelle das Laminin der Basalmembran, wird eine Ausschüttung der inaktiven Prokollagenase IV angeregt. Diese wird durch die in der Umgebung befindliche Serinprotease Plasmin aktiviert und löst die Basalmembran an besagter Stelle auf. Die Verankerung im Zielgewebe erfolgt über das Fibronectin im interstitiellen Bindegewebe, an das die Zelle über entsprechende Rezeptoren binden kann (siehe Abb. 1.7).^[4, 18] Die Metastasierung erfolgt dadurch, dass Tumorzellen in das Blut- oder Lymphgefäßsystem eindringen und so in einen anderen

Einleitung

Bereich des Körpers transportiert werden. Hat sich eine Tochtergeschwulst angesiedelt, erfolgt die Entwicklung analog zum Primärtumor.^[4, 5, 32]

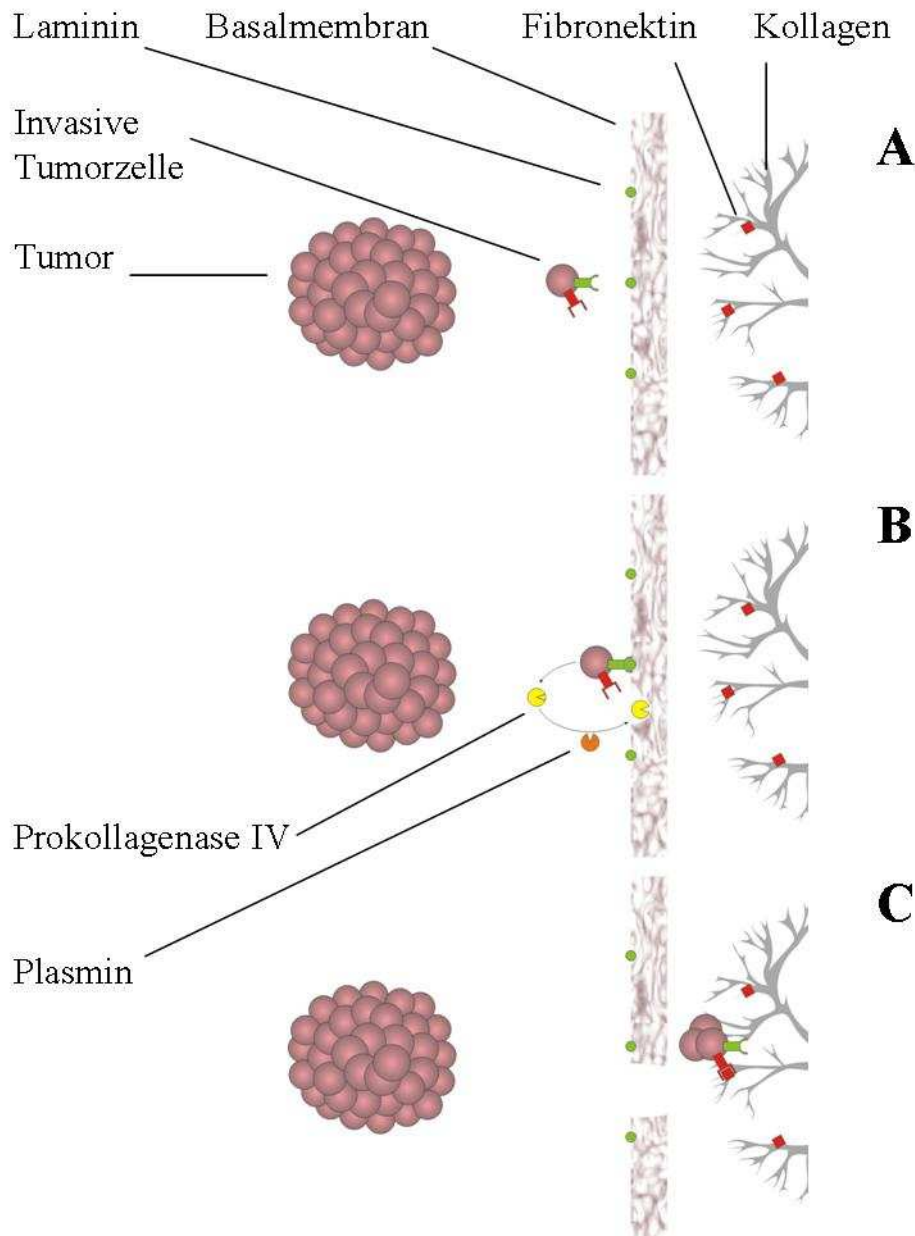


Abbildung 1.7: Invasion einer Krebszelle

Teilbild A ist eine Tumorzelle zu sehen, die sich aus dem Zellverband gelöst hat und im Begriff ist, in das Nachbargewebe einzudringen. In Teilbild B ist dargestellt, wie infolge der Bindung an Laminin die Prokollagenase IV freigesetzt wird. Diese bewirkt nach der Aktivierung durch Plasmin einen Abbau der Basalmembran. Teilbild C zeigt, wie sich die Tumorzelle über Fibronectinrezeptoren im Zielgewebe festsetzt. Dort erfolgt dann das Wachstum einer Tochtergeschwulst. Bild nach ^[4]

Die von einem Tumor verursachten Schäden können verschiedene Krankheitsbilder umfassen. Wächst ein Tumor an einer Gefäßwand oder in der Nähe eines Gefäßes, kann er dieses verengen und es kann in der Folge zur Bildung von Thrombosen kommen. Es kann auch eine Ulzeration auftreten, d.h. ein Blutgefäß wird erodiert, der Bluttransport wird dadurch unterbrochen und es kommt zu inneren Blutungen. Durch einen Tumor kann auch eine Fistel, eine ungewollte Verbindung, zwischen zwei benachbarten aber ansonst getrennten Hohlorganen, entstehen. Haben sich Tumorzellen im Knochen festgesetzt, wird das Knochengewebe abgebaut, was eine Verringerung der mechanischen Stabilität zur Folge hat. So kann es schneller zu Brüchen kommen. Man spricht hierbei von pathologischen Frakturen. Neben diesen offensichtlichen Gewebeveränderungen, kann ein Tumor den Patienten auch durch die Freisetzung von Stoffwechselprodukten, wie z.B. Hormonen, schädigen. Das dadurch verursachte Krankheitsbild wird als paraneoplastisches Syndrom bezeichnet. Eine weitere Auswirkung ist die Kachexie, eine durch den gesteigerten Energiebedarf des Tumors verursachte Auszehrung des Körpers.^[4]

1.1.4 Apoptose und Nekrose

Der Begriff Apoptose kommt aus dem griechischen, bedeutet wörtlich übersetzt „wegfallen“ und leitet sich von dem Fallen der Blätter im Herbst ab. Er wurde erstmals von Kerr et. al im Jahr 1972 verwendet.^[1, 33] Als Apoptose bezeichnet man das kontrollierte Absterben einzelner Zellen zum Wohl des gesamten Organismus. Sie ist bei vielen biologischen Prozessen wie z.B. der Embryonalentwicklung und der Homöostase der Lymphozyten von entscheidender Bedeutung. Fehlregulationen der Apoptose haben oft schwerwiegende Folgen, wie z.B. AIDS oder die Alzheimer-Krankheit.^[34, 35] Die Umgehung der Apoptose ist einer der entscheidenden Schritte bei der Krebsentstehung.^[13] Wie das Synonym „kontrollierter Zelltod“ schon andeutet, handelt es sich hierbei um einen hochgradig durchorganisierten und komplexen Prozess – sowohl in Bezug auf die Initiierung als auch den Ablauf. Noch sind nicht alle Details dieser Vorgänge geklärt. Man geht davon aus, dass die Fähigkeit zur Apoptose im genetischen Code jeder Zelle verankert ist, doch Signale dafür sorgen, dass dieser Vorgang nicht ohne besonderen Anlass ausgelöst wird. Es gibt eine Reihe von Signalwegen, die eine Apoptoseinitiierung bewirken. Man kann sie in extrinsische und intrinsische unterteilen. Der extrinsische Weg benötigt als Auslöser ein externes Signal, das von den Todesrezeptoren an der Zelloberfläche registriert wird. Als Beispiel sei hier der Ligand FasL aufgeführt, der an den Rezeptor Fas bindet. Die Rezeptoren aktivieren in der Folge Botenstoffe, die ihrerseits Effektoren einschalten, die den Ablauf der Apoptose bewirken. Im Fall des aktivierten Fas geschieht dies, indem an dessen als Todesdomäne bezeichneten cytoplasmischen Teil der Adapter FADD bindet. Dadurch wird der *death inducing signalling complex* (DISC) gebildet, an den mehrere Moleküle der Procaspase 8 andocken können. Caspasen sind cysteinabhängige, aspartatspezifische Proteasen, die Schlüsselpositionen in den verschiedenen Signalwegen der Apoptose einnehmen. Caspase 8 liegt wie die meisten anderen Caspasen in einer nur schwach aktiven Proform vor, die erst nach Abspaltung eines Teils ihre volle Wirkung entfaltet. Dies geschieht autoproteolytisch durch die räumliche Nähe mehrerer Moleküle infolge der Bindung. Caspase 8 prozessiert jetzt andere Caspasen, wie z.B. 3 und 7, die aktiv wichtige Zellproteine zerstören. Da durch ein Caspasmolekül mehrere Folgemoleküle aktiviert werden können, spricht man hierbei auch von einer Caspasekaskade (siehe Abb 1.8). Neben diesem von FasL ausgelösten Initiationsweg gibt es noch eine Reihe weiterer, die nach einem vergleichbaren Prinzip funktionieren.^[1, 36]

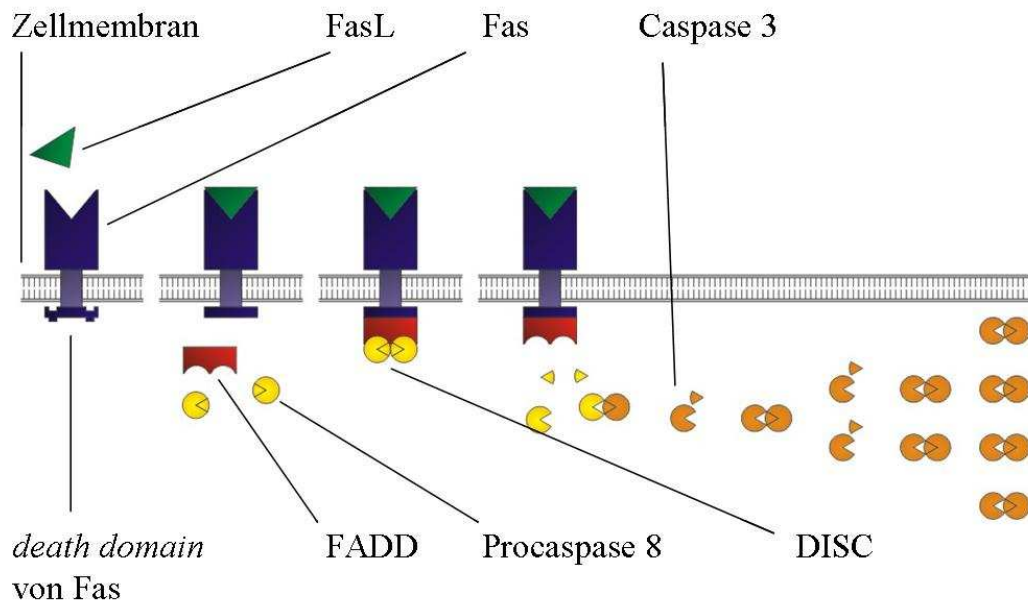


Abbildung 1.8: Ablauf der extrinsischen Apoptoseinitiation

Der apoptoseinduzierende Ligand FasL bindet an den Todesrezeptor Fas woraufhin an diesen der Adapter FADD andocken kann. An den dadurch entstehenden Komplex DISC heften sich nun mehrere Procaspase 8-Moleküle, die autoproteolytisch aktiviert werden. Caspase 8 prozessiert anschließend die Procaspase 3, die das Induktionssignal weiterleitet. Bild nach ^[36]

Der intrinsische Weg zeichnet sich dadurch aus, dass die Apoptose nicht durch ein Signalmolekül von außen initiiert wird, sondern von der Zelle selbst. Als Auslöser fungieren hierbei Zellstressbedingungen, die nicht mehr zu beheben sind, wie z.B. DNA-Schäden oder die Folgen von Hitzeschocks. Diese Zustände werden von den Mitochondrien registriert, die als zentrale Kontrolleinheiten für diesen Wirkmechanismus fungieren. Sie reagieren mit dem Abbau des Transmembranpotentials in Verbindung mit der Permeabilisierung ihrer Membranen durch die Öffnung der *permeability transition pores*. Dies führt dazu, dass Ca^{2+} -Ionen osmosebedingt in die Mitochondrien einströmen, was wiederum einen Einfluss von Wasser zur Folge hat. Dies wiederum verursacht ein Anschwellen der Mitochondrien. Es treten nun Cytochrom c und andere proapoptotische Faktoren wie Apaf-1 ins Cytosol aus. Zusammen mit Cytochrom c und ATP bilden sieben Moleküle Apaf-1 eine radförmige Struktur, an die zwei Moleküle der 45 kDa schweren Procaspase 9 binden. Aus einem dieser Moleküle entsteht die aktive Caspase 9 durch Abspaltung eines 10 kDa schweren Stücks. Dieser Proteinkomplex wird als Apoptosom bezeichnet (siehe Abb. 1.9).^[1, 37]

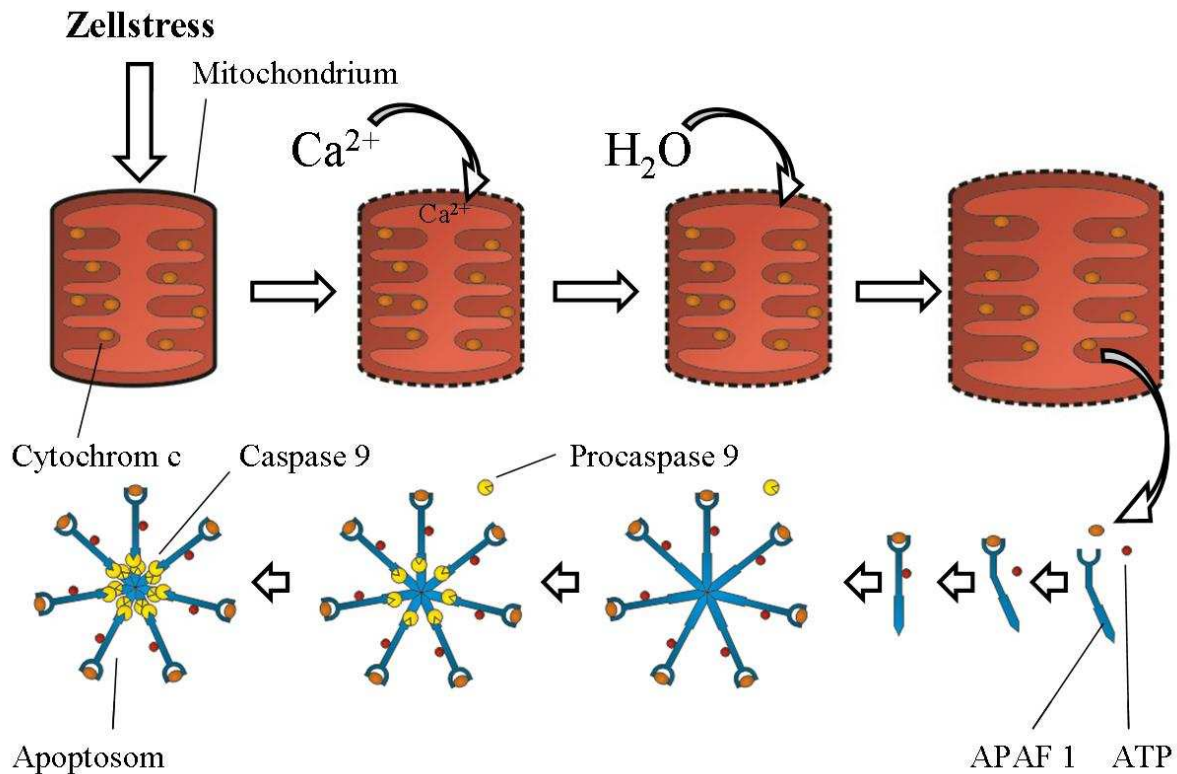


Abbildung 1.9: Ablauf der intrinsischen Apoptoseinitiation

Zellstress bewirkt bei den Mitochondrien eine Permeabilisierung ihrer Membranen. Durch Osmose strömt Ca^{2+} ein, was einen Nachstrom von Wasser bewirkt. Dies führt zu einem Anschwellen der Mitochondrien. Dadurch gelangen Cytochrom c und Apaf-1 ins Cytosol, die zusammen mit ATP einen Heptamerkomplex bilden. Dieser bindet je zwei Moleküle der Procaspase 9 pro Arm, von denen eines aktiviert wird.^[1, 37]

Man kann den Ablauf der Apoptose in drei Schritte unterteilen. Nach der Initiierung folgt die Effektorphase in der die biochemischen Prozesse auf das Zellsterben eingestellt werden. Sie geht in die Abbauphase über, in der die physiologischen Veränderungen sichtbar werden. Dabei verdichten sich die Chromosomen und wandern in Richtung der Kernhülle. Der Kern zerfällt durch die caspasebedingte Beseitigung wichtiger Struktur- und Verbindungsproteine. Anschließend erfolgt der Abbau der Chromosomen, wobei Stücke mit einer Größe von maximal 200 Basenpaaren entstehen. Dadurch wird verhindert, dass fehlerhafte Erbinformationen an andere Zellen weitergegeben werden und diese möglicherweise schädigen. Die Zelle schrumpft und verformt sich durch Zersetzungsprozesse im Cytoskelett, wodurch sie den Kontakt zu den Nachbarzellen verliert. Es bilden sich *apoptotic bodies*, Ausstülpungen der Plasmamembran, die das Cytosol und abgebaute Zellbestandteile enthalten. Sie schnüren sich ab und werden per Phagozytose von Macrophagen

aufgenommen (siehe Abb. 1.10). Auf diese Weise wird verhindert, dass potentiell schädliche Stoffe in die Umgebung abgegeben werden. Damit die Macrophagen die *apoptotic bodies* erkennen können, wird Phosphatidylserin, das bei vitalen Zellen an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, auf die Außenseite gebracht.^[1, 36, 38]

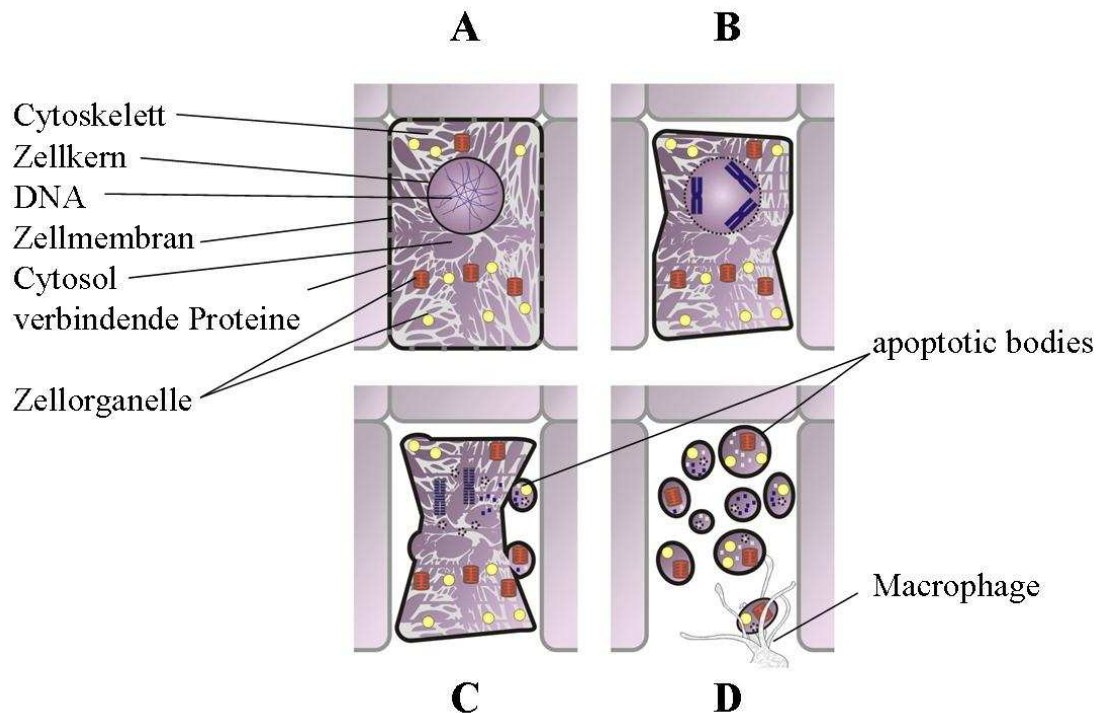


Abbildung 1.10: Physiologischer Verlauf der Apoptose

Teilbild A zeigt eine Zelle im Urzustand. Nach Initiierung der Apoptose kommt es zu einer Verdichtung des Chromatins. Die Zelle schrumpft und verformt sich durch den Abbau des Cytoskeletts (B). Der Zellkern löst sich auf und die Chromosomen werden durch DNasen zerstückelt (C). Es kommt zur Ausbildung der *apoptotic bodies*, in denen die Zellbestandteile enthalten sind und die anschließend von Macrophagen abgebaut werden (C und D). Bild nach ^[36, 38]

Eine weitere Möglichkeit des Zelltods stellt die Nekrose dar. Hierbei handelt es sich nicht um einen erwünschten und kontrollierten Vorgang, sondern sie ist die Folge einer gravierenden Schädigung der Zelle durch äußere Einflüsse, z.B. durch Hitze oder mechanische Belastung. Ihr Ablauf unterscheidet sich deutlich von dem geordneten Abbau, den man bei der Apoptose beobachten kann. Es geht früh die Integrität der Plasmamembran verloren und der diffusionsbedingte Einstrom von Elektrolyten und Wasser führt zu einem Anschwellen und Aufplatzen der Zelle. Die dadurch freiwerdenden Zellbestandteile können ungehindert in das umgebende Gewebe gelangen, was zu einer Entzündungsreaktion führt. Die DNA liegt in

Einleitung

unregelmäßigen Klumpen vor und die Zellorganellen, die in den *apoptotic bodies* noch intakt sein können, sind meist ebenfalls geschädigt oder zerstört (siehe Abb. 1.11).^[1, 38]

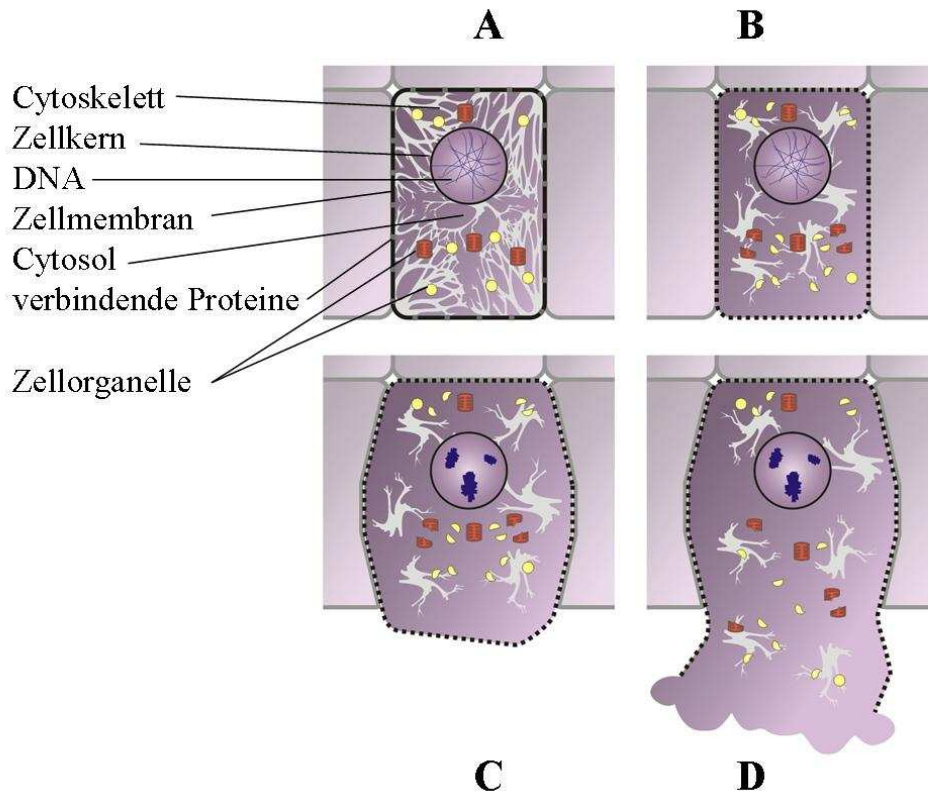


Abbildung 1.11: Physiologischer Verlauf der Nekrose

In Teilbild A ist eine Zelle im ursprünglichen Zustand dargestellt. Infolge externer Einflüsse werden Zellorganelle geschädigt und die Plasmamembran verliert ihre Integrität (B). Die DNA verklumpt. Es kommt zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zelle, wodurch der Zellinhalt in das umgebende Gewebe gelangt (C und D). Dies führt zu einer Entzündung. Bild nach ^[38]

Nekrose kann auch als Folge der Apoptose auftreten, man spricht hierbei von sekundärer Nekrose. Dieser Fall tritt ein, wenn die abgeschnürten *apoptotic bodies* nicht rechtzeitig phagozytiert werden. Bei einer anderen Differenzierung wird der Begriff Nekrose nur für postmortale Prozesse verwendet, die infolge der Onkose oder Apoptose auftreten. Als Onkose werden hierbei kontrollierte Vorgänge bezeichnet, die zum Zelltod infolge einer Schwellung der Zellen führen.^[36] Da die Nekrose einen für den Körper schädlichen Vorgang darstellt, sucht man bei der Erforschung neuer Chemotherapeutika nach Verbindungen, die vornehmlich den apoptotischen Zelltod auslösen.

1.2 Die Bekämpfung von Krebs und die Wirkung von Cytostatika

1.2.1 Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen

Die Krebsbekämpfung kann auf verschiedene Arten erfolgen, wobei sich die Therapieform in hohem Maß nach dem spezifischen Krankheitsbild richtet. Essentiell hierfür ist eine frühzeitige Entdeckung und Charakterisierung durch Zytodiagnostik und histologische Untersuchungen. Erst dann lässt sich eine geeignete Therapie entwickeln, wobei oftmals mehrere Behandlungsmethoden kombiniert werden.^[1, 4] Eine Behandlungsmöglichkeit stellt die operative Entfernung eines Tumors dar. Dies ist für den Organismus meist schonender als andere Eingriffe, doch aufgrund der Lage einer Geschwulst nicht immer durchführbar. Bei der Strahlentherapie wird der Tumor energiereicher ionisierender Strahlung ausgesetzt, der gegenüber Krebszellen anfälliger sind als gesunde Körperzellen. Dennoch ist dies auch immer schädlich für gesundes Gewebe und kann Mutationen verursachen. Diese können im schlimmsten Fall dazu führen, dass es zu einer Zweitkrebserkrankung kommt.^[1] Eine weitere Möglichkeit ist die onkologische Immuntherapie, bei der versucht wird, das Immunsystem des Patienten dazu zu bringen, dass es die Tumorzellen als Gefahr erkennt.^[1, 4] Eine der wichtigsten Behandlungsmethoden ist die Chemotherapie, bei der man Giftstoffe einsetzt, die die Krebszellen schädigen sollen. Verbindungen, die bewirken, dass die Zellteilung eingestellt wird, bezeichnet man als cytostatisch, solche die ein Absterben verursachen als cytotoxisch. Es gibt hierbei eine Vielzahl verschiedener Verbindungsklassen mit unterschiedlichen Angriffspunkten, von denen einige in den nachfolgenden Kapiteln näher beleuchtet werden (siehe 1.2.2 bis 1.2.6). Ähnlich wie bei der Strahlentherapie können auch bei der Chemotherapie gesunde Körperzellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Neben gravierenden Gewebeschäden besteht auch hier langfristig die Gefahr der Ausbildung von Zweittumoren. Ein weiteres Problem sind mögliche Resistenzen, z.B. durch enzymatischen Abbau oder überexprimierte Transportproteine. Deshalb sind die grundlegenden Ziele bei der Entwicklung neuer Cytostatika die Überwindung von Resistenzen und Verbesserung der Spezifität.^[1]

1.2.2 Cisplatin und andere bioaktive Metallkomplexe

Eine der wichtigsten Verbindungen, die in der Chemotherapie eingesetzt wird, ist *cis*-Diammindichloroplatin(II) **1**, oft auch nur Cisplatin bezeichnet (siehe Abb. 1.12). Dabei handelt es sich um einen planaren Komplex von Platin(II) mit zwei Ammin- und zwei Chlorliganden.^[39] Die cytotoxischen Eigenschaften von **1** wurden 1965 von Barnett Rosenberg entdeckt, der den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Zellteilung untersuchen wollte. Heutzutage stellen platinhaltige Substanzen eine der am häufigsten eingesetzten Stoffklasse bei der Chemotherapie dar. Bei der Hälfte aller Behandlungen sind sie beteiligt.^[40] Das eigentlich wirksame Molekül ist dabei aber nicht **1**, sondern es sind die entsprechenden Aquakomplexe **1a** und **1b**, die durch Hydrolyse im Cytosol gebildet werden (siehe Abb. 1.12). **1** wird deshalb auch als Prodrug bezeichnet. Es kann durch passiven Transport via Diffusion und aktiv über den Kupfertransporter Ctr1P in die Zelle gelangen.^[39, 41]

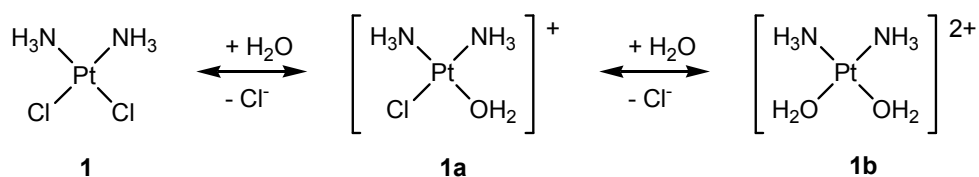


Abbildung 1.12: Aktivierung von 1

1 tauscht im wässrigen Cytosol ein Chlor gegen ein Wassermolekül aus, wodurch die aktive Aquaspezies **1a** gebildet wird. Durch einen weiteren Austausch kann die ebenfalls reaktive Diaquaspezies **1b** entstehen.^[39, 41]

Die für die Cytotoxizität relevante Wirkung von **1a** und **1b** beruht auf ihrer Fähigkeit, kovalent an die DNA zu binden und diese zu vernetzen.^[39 - 41] Die Bindung erfolgt dabei über eine S_N2-Reaktion, wobei immer ein Wassermolekül gegen die Base ausgetauscht wird. Das N7 des Guanins stellt aufgrund seiner Nukleophilie hierbei den bevorzugten Partner dar. Die häufigste Folge ist die Intrastrang-Quervernetzung, daneben können aber auch Interstrangverknüpfungen, Bindungen an Proteine oder Chelatbildungen auftreten (siehe Abb. 1.13).^[39, 41]

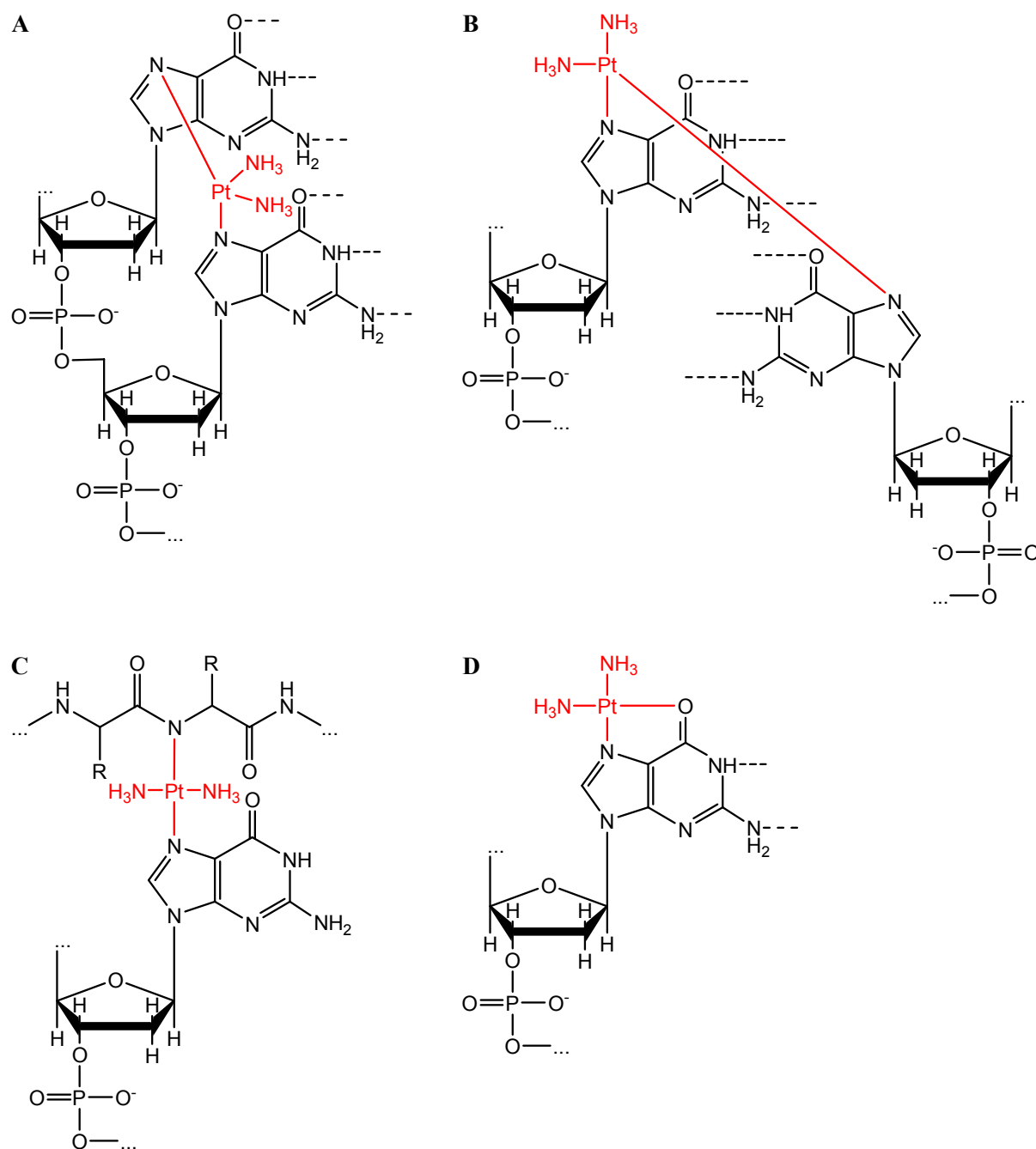


Abbildung 1.13: Wirkung von 1

Zu sehen sind Beispiele für die vier verschiedenen Möglichkeiten wie **1** mit der DNA interagieren kann. Teilbild A zeigt eine Intrastrangvernetzung, Teilbild B eine Interstrangverknüpfung. In Teilbild C ist die Bindung an ein Protein dargestellt und in Teilbild D den Chelatkomplex mit einer Guaninbase. Der Cisplatin teil in den Molekülen ist rot gezeichnet, in Teilbild A sind die einzelnen Atome eines Guanins nummeriert.^[39]

Durch die Bindung von **1** an die DNA, wird die Struktur der Helix gestört, Replikation und Transkription werden unterbunden und schlussendlich wird die Apoptose ausgelöst.^[41, 42] Der Grund, weshalb **1** auch mehr als 30 Jahre nach der Einführung immer noch intensiv genutzt

Einleitung

wird, ist, dass die Verbindung ein sehr breites Wirkungsspektrum aufweist. Allerdings limitieren die starken Nebenwirkungen, wie Brechreiz und vor allem Nierenschäden den Einsatz. Außerdem bestehen weitläufige Resistenzen gegenüber **1** durch aktiven Transport aus der Zelle, die Reparatur von DNA-Schäden oder das Abfangen der Verbindung durch Proteine oder Glutathion.^[40 - 42] Es wurde eine Vielzahl von Derivaten von **1** entwickelt, von denen es bisher nur einige wenige in die klinische Praxis schafften (siehe Abb. 1.14). Die Derivatisierung erfolgt im Allgemeinen durch den Austausch der Chlor- und/oder Amminliganden gegen einen oder mehrere organische Liganden. Dabei setzt man zum einen auf eine Veränderung der chemischen Eigenschaften und Wirkungskinetik, zum anderen auf einen besseren Transport in die Zelle. Die wichtigsten Derivate stellen Carboplatin **1c** und Oxaliplatin **1d** dar, da diese inzwischen weltweit als Medikamente zugelassen sind.^[41, 42] Von der Firma Bristol-Myers-Squibb wurde die Pt(IV)-Verbindung Satraplatin **1e** entwickelt. Man geht davon aus, dass das verglichen mit **1** stabilere **1e** infolge der Metabolisierung im Cytosol zu einer eigentlich wirksamen Pt(II)-Spezies abgebaut wird, die vergleichbar wie **1** agiert. Eine gesteigerte Selektivität erhofft man sich auch durch die Verwendung bioaktiver Liganden wie z.B. bei Bamet UD2 **1f**. Bei dieser Verbindung sind zwei Gallensäuremoleküle an den Platinkern gebunden, wodurch man sich eine bessere Aufnahme in die Leber erhofft.^[41]

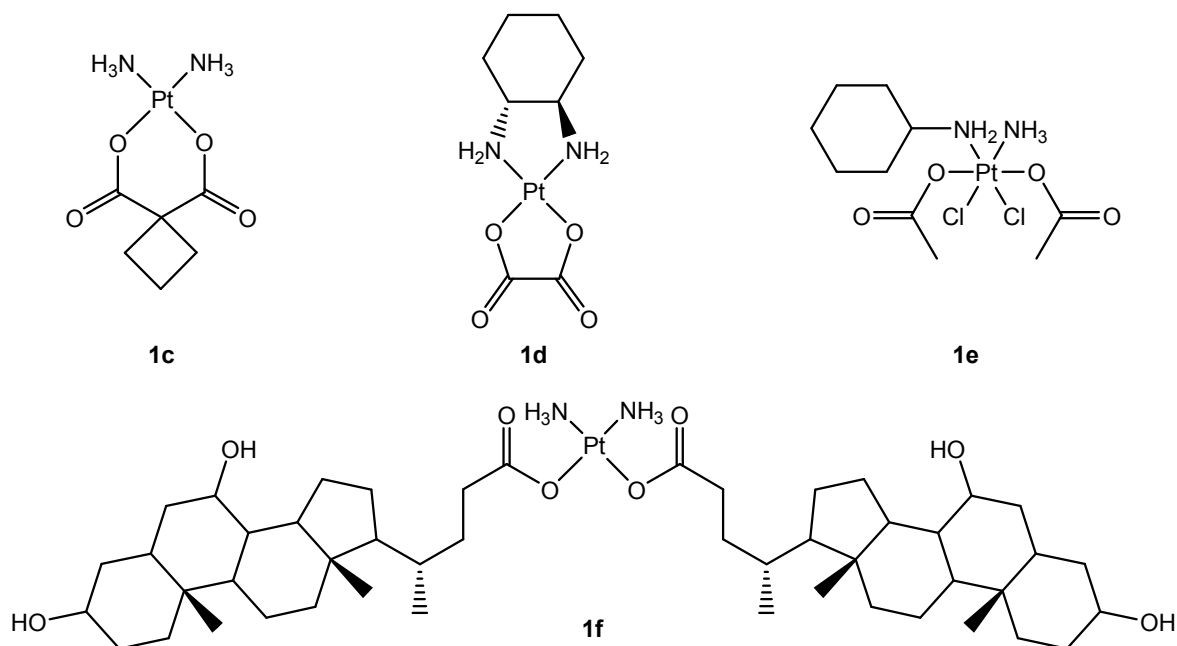


Abbildung 1.14: Strukturen von platinhaltigen Cytostatika

In der Abbildung sind die Strukturen der von **1** abgeleiteten Chemotherapeutika Carboplatin **1c**, Oxaliplatin **1d**, Bamet UD2 **1f**, sowie die des cytotoxischen Pt(IV)-Komplexes Satraplatin **1e** dargestellt.^[41]

Neben Platin wurden auch andere Metalle wie Ruthenium (z.B. **2a** und **2b**) und Gallium (z.B. **3**) hinsichtlich ihrer Eignung als Cytostatika untersucht (siehe Abb. 1.15). Vor allem von Ruthenium erhofft man sich eine gesteigerte Selektivität, denn durch den erhöhten Eisenbedarf ist bei Tumorzellen das Protein Transferrin besonders stark exprimiert-. Dieses ist auch für den Transport von Ruthenium in die Zelle verantwortlich. Die Wirkung der Rutheniumverbindungen geht vom Ru(II) aus, das im reduktiven Milieu des Cytosols analog zu **1e** entsteht und wie Pt(II) an die DNA bindet. Bei dem Galliumkomplex **3** vermutet man, dass die Wirkung durch eine Beeinträchtigung der Ribonukleotidreduktase zustande kommt.^[40, 42 - 44]

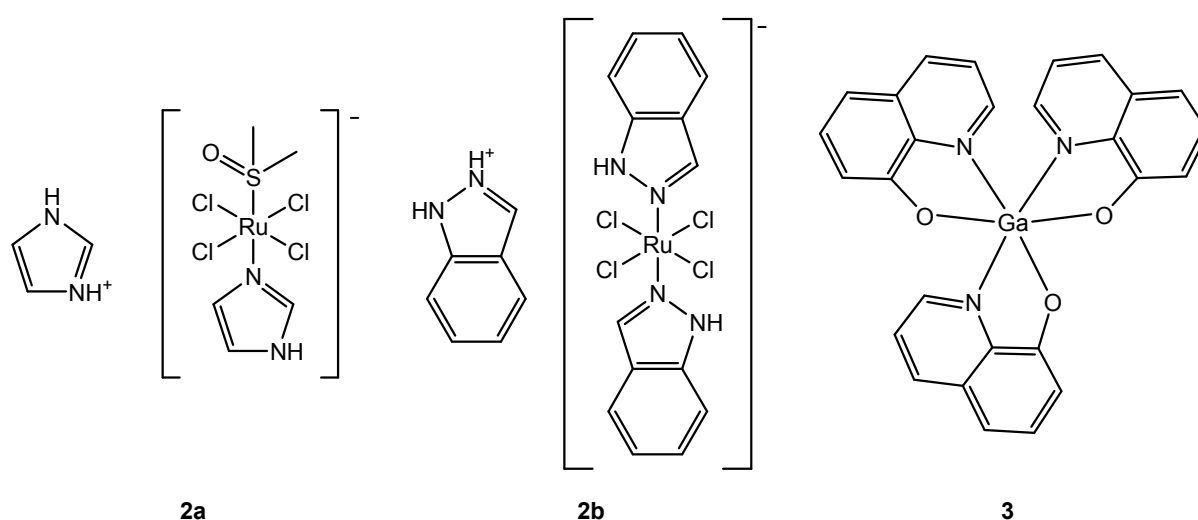


Abbildung 1.15: Strukturen von metallorganischen Verbindungen mit cytotoxischer Aktivität

In der Abbildung sind die Strukturformeln der Rutheniumderivate NAMI-A **2a** und KP1019, FCC 14a **2b** sowie die der Galliumverbindung KP46, FFC11 **3** zu sehen.^[40]

Die hier aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass Metallkomplexe ein medizinisch äußerst interessantes Forschungsgebiet darstellen, das noch lange nicht ausgereizt ist.

1.2.3 Hormone als Cytostatika

Neben synthetischen Cytostatika wie **1** existieren mit den Hormonen auch körpereigene Verbindungen, die eine Wirkung gegenüber Krebszellen haben. Der Begriff leitet sich vom griechischen Wort *horman* ab, was anregen bzw. antreiben bedeutet. Der erste Vertreter dieser Gruppe, das Adrenalin **4**, wurde 1902 isoliert.^[45, 46] Besonders wichtig für die Krebstherapie sind die Estrogene. Dabei handelt es sich um Steroidhormone, die sich von dem Grundgerüst Estran **5** ableiten und je nach Vertreter an verschiedenen Stellen substituiert sind. Das erste Estrogen, Estron **5a**, wurde 1929 aufgereinigt (siehe Abb. 1.16).^[45 - 47]

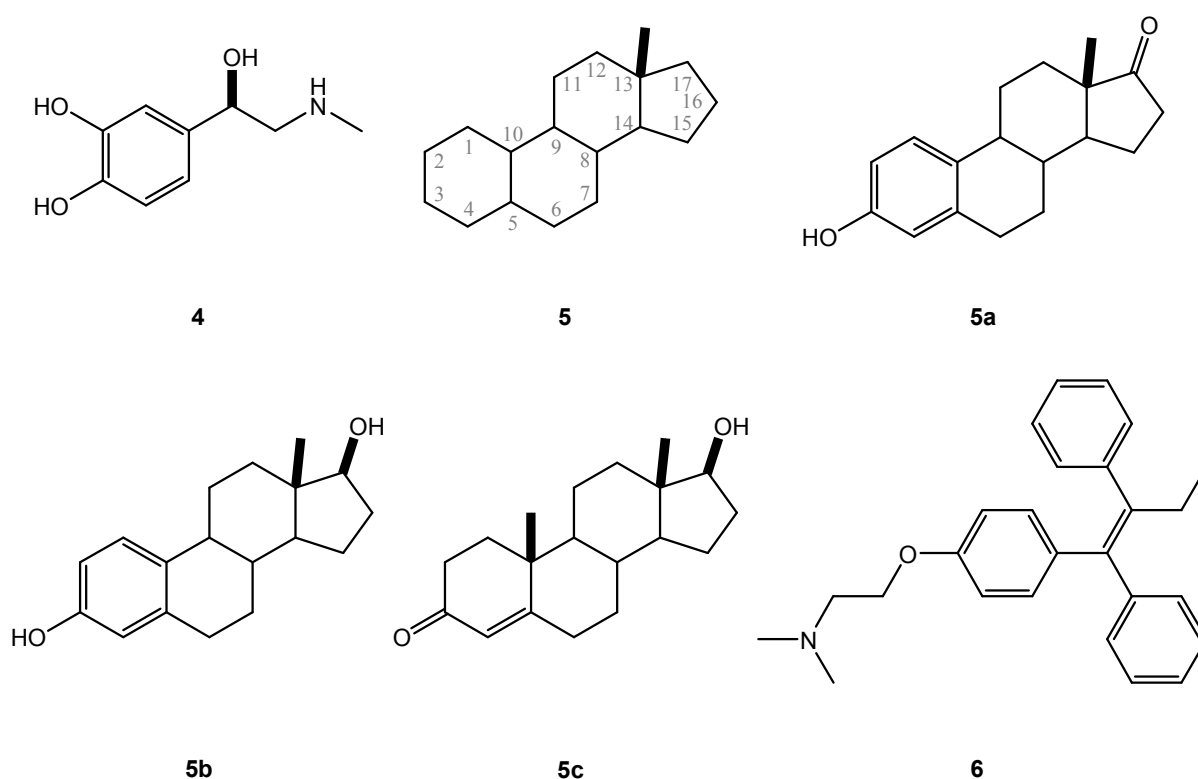


Abbildung 1.16: Strukturen von verschiedenen Hormonen

Zu sehen sind die Strukturformeln verschiedener Hormone. Adrenalin **4** ist das erste isolierte Hormon. Die Estrogene Estron **5a** und Estradiol **5b** sowie die des Androgens Testosteron **5c** leiten sich Steroidgrundkörper Estran **5** ab. Tamoxifen **6** ist ein künstliches Hormon. Die Kohlenstoffatome in **5** sind nummeriert.^[46, 47]

Estrogene wie **5a** und **5b** sind weibliche Sexualhormone und als solche für die Veränderungen in der Pubertät und für die Steuerung der ovariellen Aktivität verantwortlich. Darüber hinaus haben sie aber auch noch weitere, geschlechtsunabhängige Funktionen, z.B. bei der Entwicklung der Knochen. Sie binden als Botenstoff an einen spezifischen Rezeptor,

der dann infolge einer Konformationsänderung aktiviert wird und die Transkription reguliert. Dies kann direkt durch Bindung an die DNA oder indirekt durch die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren erfolgen. Hormone können hierbei je nach Gewebe sowohl eine agonistische als auch eine antagonistische Funktion ausüben, was man sich bei der Tumorthherapie zu Nutzen macht. So kann z.B. das künstliche Hormon Tamoxifen **6** das Wachstum von Brustkrebs inhibieren. Die entsprechenden männlichen Sexualhormone mit analoger Wirkung bezeichnet man als Androgene. Ein Beispiel hierfür ist **5c**.^[47, 48] Da die Wirkung von Hormonen stark strukturabhängig ist, sind die Möglichkeiten zur Derivatisierung einschränkt. Inzwischen ist allerdings die Bindungsstelle der Estrogenrezeptoren hinreichend gut untersucht, so dass man Moleküle wie z.B. **6** gezielt an die gegebenen Rezeptorstrukturen anpassen kann.^[48]

Hormone sind in zweierlei Hinsicht interessant für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika. Zum einen als potentielle Shuttlegruppen, die einen Transport in die Zelle erleichtern können, zum anderen aber auch direkt als Effektorgruppen.

1.2.4 Combretastatine

Eine weitere Klasse cytotoxischer Verbindungen stellen die Combretastatine dar. Bei ihrem Grundgerüst handelt es sich um einen Trimethoxyphenylring, der über eine unterschiedlich gestaltete C2-Einheit an einen mehrfach substituierten Phenylring gebunden ist. Der Name leitet sich von der Südafrikanischen Buschweide *Combretum caffrum* ab. Aus deren Borke war erstmalig ein Vertreter dieser Stoffklasse isoliert worden, das Combretastatin **7**.^[49] Diese Verbindung weist cytotoxische Eigenschaften auf, medizinisch relevanter ist allerdings das natürliche Stilben Combretastatin A-4 **7a** (siehe Abb. 1.17), das meist in Form des besser löslichen Phosphats **7b** verabreicht wird.^[50 - 52]

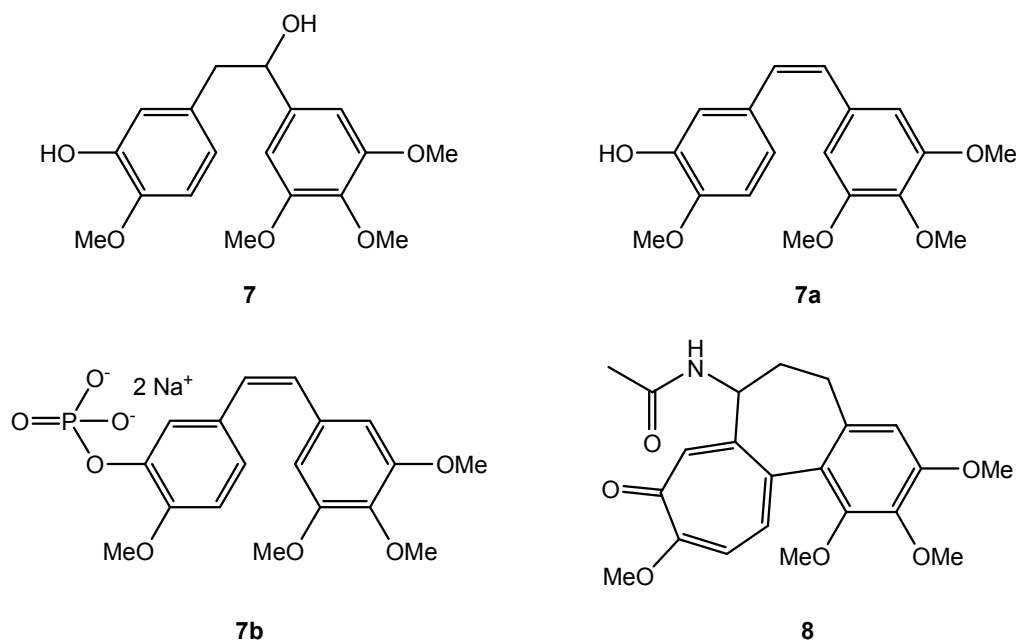


Abbildung 1.17: Verschiedene Combretastatine und Colchicin 8

Zu sehen ist die Struktur der Ursprungssubstanz Combretastatin **7**, die des medizinisch bedeutenderen Combretastatin A-4 **7a**, sowie die des entsprechenden Phosphats **7b**. Ebenfalls aufgeführt ist die Struktur des Spindelgifts Colchicin **8**.^[12, 50 - 52]

Der Wirkmechanismus der Combretastatine ist analog zu dem von Colchicin **8** (siehe Abb. 1.17), dem Gift der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale*. Die Verbindungen hemmen die Tubulinpolymerisation der Mikrotubuli.^[12, 53] Dabei handelt es sich um Röhren, die aus den Monomeren α - und β -Tubulin aufgebaut werden. Dieser Prozess ist ein dynamisches

Gleichgewicht zwischen Assoziation am einen und Dissoziation am anderen Ende. Wenn sich ein Mikrotubulus mit dem Ende, an dem die Depolymerisation erfolgt, an ein Kinetochor angelagert, ist keine Abspaltung des Tubulins mehr möglich. Es kommt so zu einer Verlängerung, da die Polymerisation weiterhin stattfindet.^[12] **8** ist nun in der Lage an eine bestimmte Stelle im β -Tubulin, die *colchicine binding site*, zu binden, was eine Veränderung in der Sekundärstruktur dieses Proteins bewirkt. Diese verhindert die Bindung von α -Tubulin und die Polymerisation kommt zum Erliegen (siehe Abb. 1.18).^[12, 53] **7b** zeigt eine vergleichbare Wirkung, ist aber deutlich verträglicher als **8**, da Bindung und Ablösung von der *colchicine binding site* wesentlich schneller erfolgen.^[52, 54]

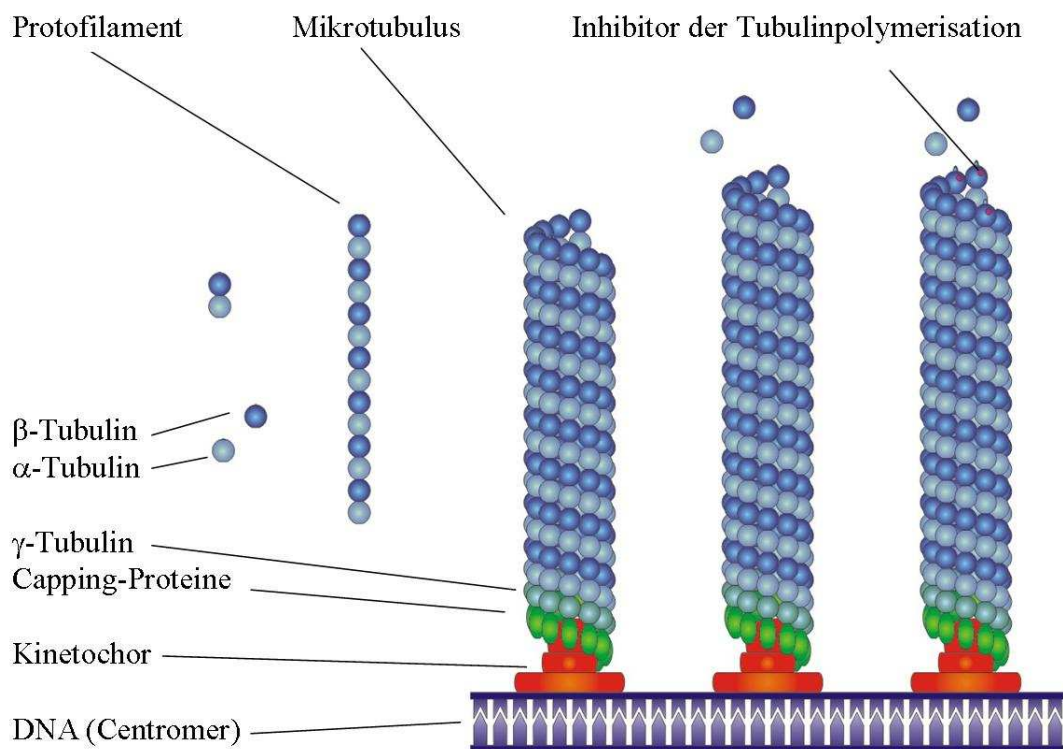


Abbildung 1.18: Aufbau eines Mikrotubulus

Aus α - und β -Tubulin bilden sich Heterodimere, die sich zu den Protofilamenten zusammenlagern. 13 dieser Protofilamente bilden eine Röhre, den Mikrotubulus. Über γ -Tubulin und Capping-Proteine stellen die Mikrotubuli eine Verbindung zum Kinetochor her, das an der DNA anliegt. Am anderen Ende findet weiter eine Verlängerung des Mikrotubulus statt. Durch die Bindung von Inhibitoren an das β -Tubulin kommt es zu einer Strukturveränderung, wodurch die Anlagerung von α -Tubulin nicht mehr erfolgen kann und die Polymerisierung unterbunden wird.^[12, 52 - 54] Bild nach ^[55]

In der Prometaphase stellen die Mikrotubuli über die Kinetochore Kontakt zu den Chromatiden her. Sie sind für deren Ausrichtung in der Metaphase sowie für ihre Trennung in der Anaphase verantwortlich.^[12] Unter dem Einfluss von Inhibitoren wie **7**, **7a** oder **8** kann sich kein Spindelapparat mehr ausbilden, wodurch die nachfolgenden mitotischen Schritte ausbleiben. Die Zelle arretiert in der Pro- bzw. Metaphase, was nach einiger Zeit zum Absterben der Zelle führt. Wird der Zellzyklus trotz unvollkommener Chromosomenpaarung weitergeführt, kommt es zu Polyploidien, die je nach Ausprägung zum Zelltod führen können (siehe Abb. 1.19). Man spricht hierbei auch von der *mitotic catastrophe*.^[12, 56, 57]

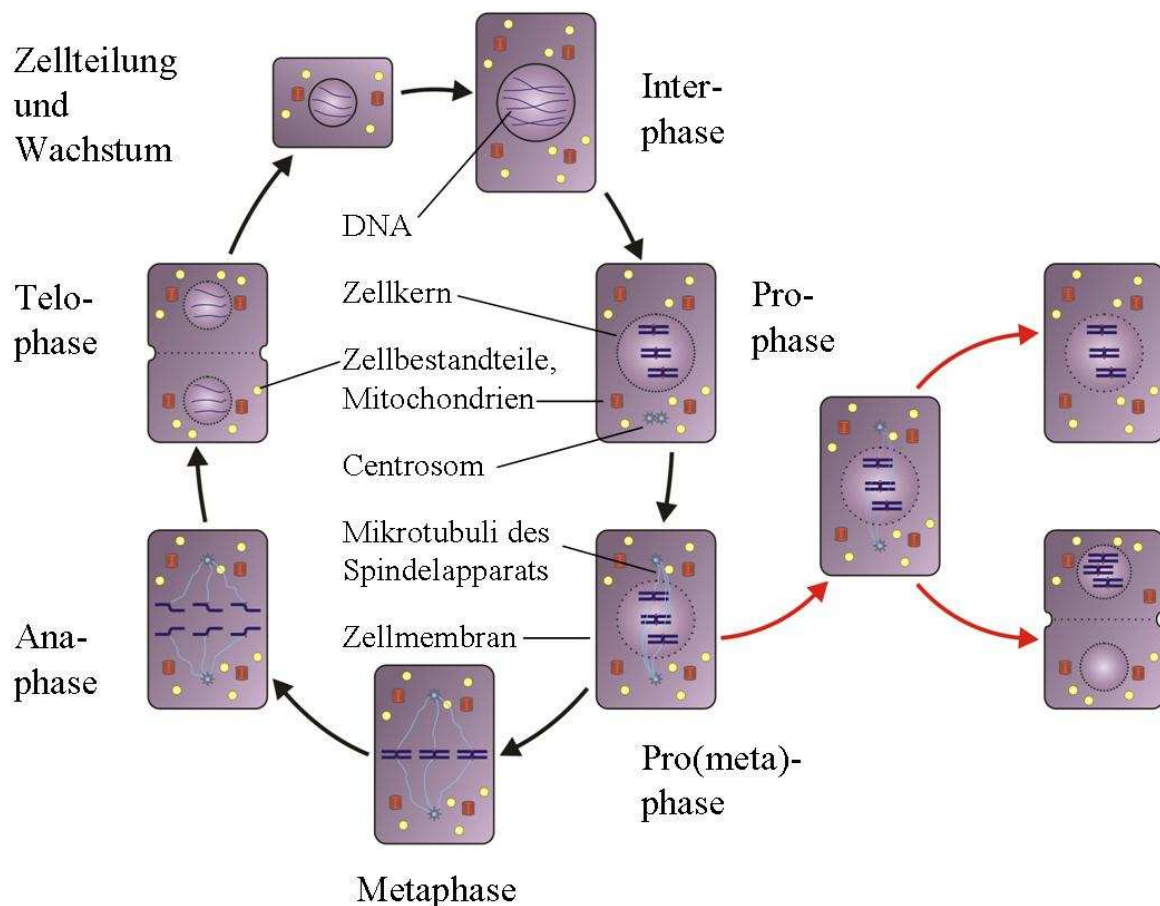


Abbildung 1.19: Ablauf der Mitose unter Einfluss von Tubulinpolymerisationshemmern

In der Prometaphase bildet sich der Spindelapparat aus, der für die Ausrichtung der duplizierten Chromosomen während der Metaphase verantwortlich ist. In der Anaphase erfolgt die Trennung der beiden Schwesterchromatiden. Durch Inhibitoren der Tubulinpolymerisation wird ein Anhalten des Zellzyklus induziert und es folgt schlussendlich ein Absterben der Zelle. Wird trotz fehlerhafter Ausbildung der Mikrotubuli die Anaphase eingeleitet, entstehen Zellen mit abnormen Chromosomenzahlen, die oftmals nicht lebensfähig sind.^[12, 56, 57] Bild nach ^[12]

Neben ihrem cytotoxischen Potential zeigen Combretastatine auch antivaskuläre Eigenschaften, die sie für medizinische Anwendungen interessant machen (vgl. 1.1.2). Diese allein reichen zwar nicht aus, um einen Tumor komplett zu vernichten, allerdings eignen sich Combretastatine dadurch gut für kombinatorische Therapieansätze. Ein zusätzlicher Vorteil der antivaskulären Wirkung ist, dass cytotoxische Substanzen aufgrund des unterbrochenen Blutflusses von den Zellen nicht mehr so gut entfernt werden können. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Trapping*.^[21, 23, 52, 54] Man geht davon aus, dass die antivaskulären Eigenschaften auf der Fähigkeit zur Depolymerisierung der Mikrotubuli in den Endothelzellen beruhen. Hierbei sind nicht nur sich teilende Zellen betroffen, sondern auch Zellen in der Interphase. Als Ursache hierfür vermutet man eine Depolymerisierung der Mikrotubuli, die beim Aufbau des Cytoskeletts beteiligt sind. Zell- bzw. Membranverformungen sind die Folge, wodurch der Blutfluss zum Erliegen kommt. Dabei kommt es auch verstärkt zum nekrotischen Zelltod.^[23, 52, 54, 58, 59] Aufgrund ihrer über die bloße Cytotoxizität hinausgehenden Wirkung eignen sich Combretastatinderivate nicht nur zur Apoptoseinduktion in Tumorzellen sondern auch zur Bekämpfung von Krebs auf Gewebeebene.

1.2.5 Stickstoff-Lost-Derivate

Auch die Loste weisen eine antitumorale Wirkung auf. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Klasse ist das unter seinem Trivialnamen Senfgas bekannte Di-(2-Chloroethyl)sulfid **9**, das im ersten Weltkrieg als Kampfstoff eingesetzt wurde. Als man bei den Überlebenden eines Angriffes, die mit **9** in Berührung gekommen waren, eine verringerte Leukozytenzahl feststellte, kam die Idee auf, derartige Verbindungen in der Krebstherapie einzusetzen. Bei den ersten Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen medizinischen Anwendung im Jahre 1942 wurde allerdings das weniger toxische Stickstoff-Analogon **9a** verwendet (siehe Abb. 1.20).^[12, 60, 61] **9** wird in Anlehnung an die Wissenschaftler Wilhelm Lommel und Wilhelm Steinkamp auch als Lost und **9a** dementsprechend auch als N-Lost bezeichnet.^[62]

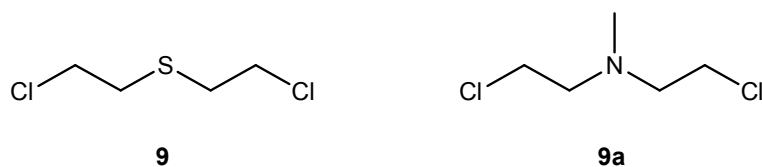


Abbildung 1.20: Die Strukturen von Senfgas **9** und dem Stickstoff-Analogon N-Lost **9a**

Die Wirkung der Loste beruht auf ihren alkylierenden Eigenschaften. Sie können kovalent an die DNA binden. Dies erfolgt, indem sich zuerst ein Chloridion abspaltet und dann durch einen internen Ringschluß das reaktive Aziridiniumion **10** gebildet wird. **10** ist in der Lage an Nukleophile wie die Heteroatome der Basen zu binden. Das N7 des Guanins, das N3 des Adenins sowie das O6 des Guanins sind hierfür besonders anfällig. Als Folge davon können eine Ringöffnung der Base, eine Quervernetzung oder ein Ablösen der Base vom Zuckerrückgrat mit anschließendem Strangbruch auftreten (siehe Abb. 1.21).^[12, 61]

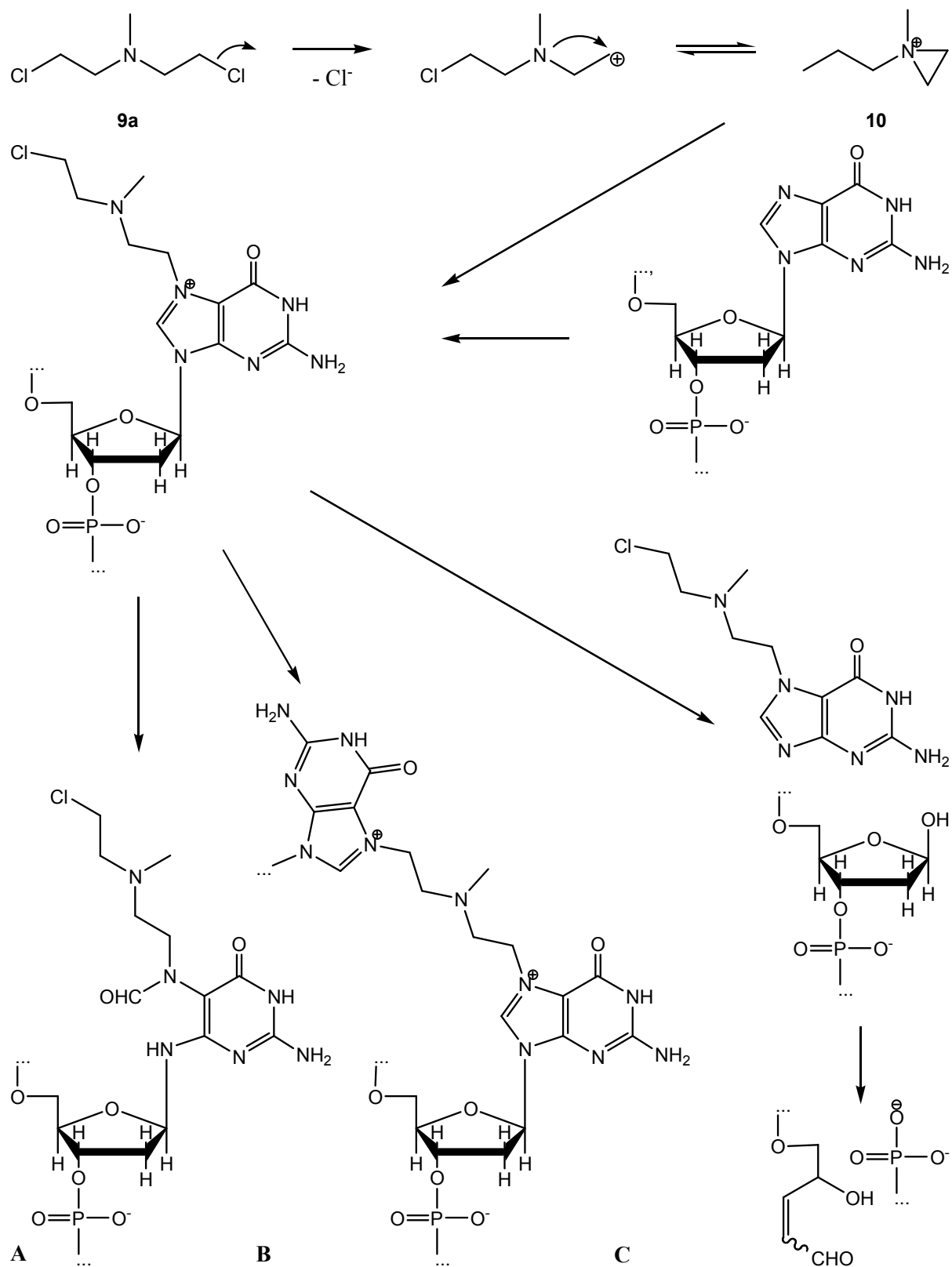


Abbildung 1.21: Wirkungsweise von 9a

Aus **9a** entsteht nach Abspaltung eines Chloridions das Aziridiniumion **10**, das an das N7 eines Guanins bindet. Nun kann es zu einer Öffnung des Imidazolrings (A), zu einer Quervernetzung (B) oder einer Abstraktion der Base mit anschließender Spaltung der DNA (C) kommen.

Einleitung

Aufgrund ihrer Fähigkeit, die DNA zu verändern, wirken Loste mutagen, was ihren therapeutischen Nutzen limitiert. Deshalb wurden großangelegte Derivatisierungsversuche unternommen um eine bessere Verträglichkeit zu erreichen. Als Folge davon wurden die Verbindungen Cyclophosphamid **9b**, Trofosfamid **9c**, Ifosfamid **9d** und Glufosfamid **9e** auf den Markt gebracht (siehe Abb. 1.22). Durch die Berücksichtigung verschiedener Reaktionen im Rahmen ihrer Metabolisierung erhofft man sich von den Derivaten eine gesteigerte Spezifität. So werden die inaktiven Prodrugs **9b**, **9c** und **9d** erst durch Phosphoramidasen und **9e** erst durch β -Glucosidase in aktive Spezies umgewandelt.^[12, 61, 63 - 65]

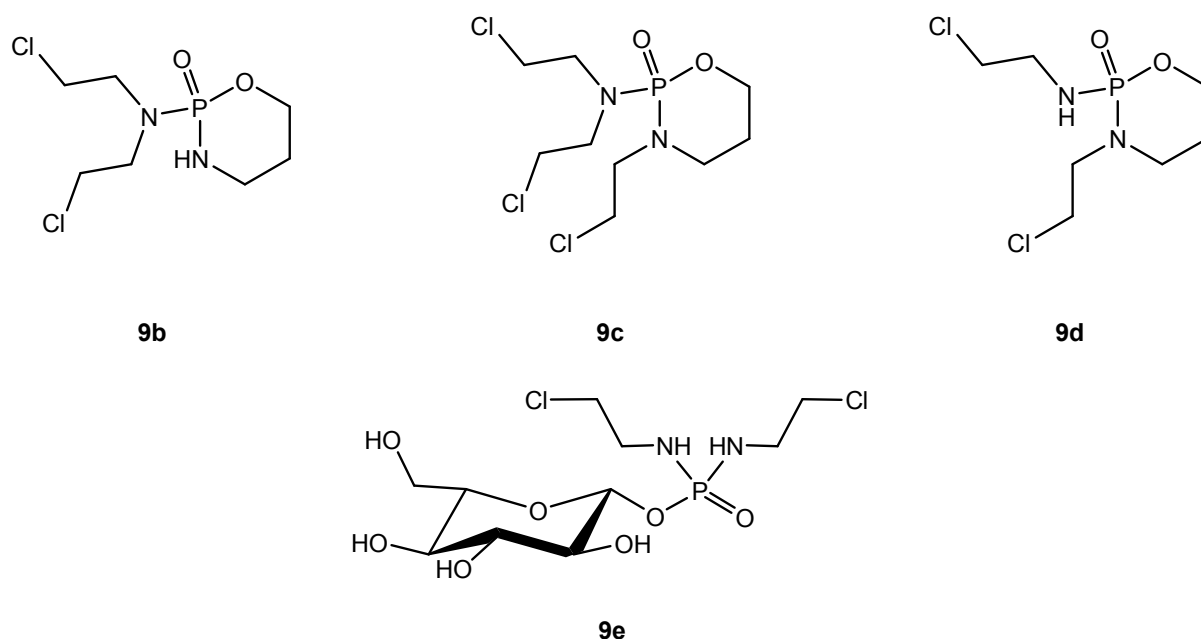


Abbildung 1.22: Medikamente auf N-Lost-Basis

Cyclophosphamid **9b**, Trofosfamid **9c**, Ifosfamid **9d** und Glufosfamid **9e**.^[63, 64]

1.2.6 Illudine

Illudine sind Sesquiterpene mit antitumoraler Wirkung, die von verschiedenen Basidiomyceten produziert werden. Die ersten und bis heute auch wichtigsten Vertreter dieser Stoffklasse sind Illudin M **11** und Illudin S **11a**. Sie waren erstmals 1950 von Anchel et al. isoliert worden, die Strukturaufklärung erfolgte 1963 (siehe Abb. 1.23).^[66 - 69]

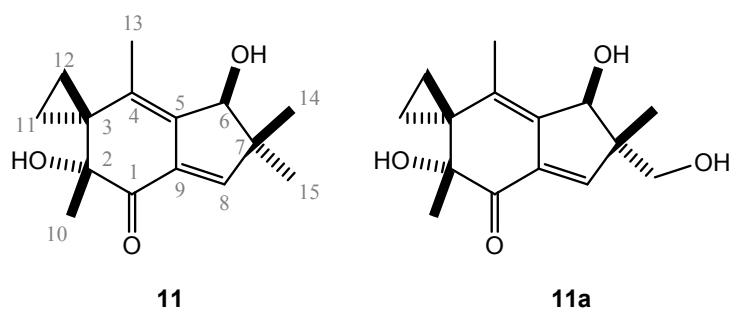


Abbildung 1.23: Strukturformeln von Illudin M **11** und Illudin S **11a**^[66 - 69]

Der Name „Illudin“ leitet sich von der Quelle, dem damals noch als *Clitocybe illudens* bezeichneten Pilz *Omphalotus olearius* ab. Die Bezeichnungen „Illudin M“ und „Illudin S“ rühren von der antibakteriellen Aktivität gegen *Mycobacterium smegma* bzw. *Staphylococcus aureus* her.^[66, 67, 70] Seit der ersten Isolierung von **11** und **11a** sind noch weitere Illudine und Produzenten dieser Stoffe entdeckt worden.^[70 - 79]

Der Wirkmechanismus der Illudine ähnelt dem der Loste, sie alkylieren die DNA.^[80] Das Michael-System der Illudine reagiert unter leicht sauren Bedingungen mit Thiolen wie z.B. Glutathion oder Cysteinen. Dabei wird das reaktive Zwischenprodukt **11b** gebildet, das über den Cyclopropanring an die DNA binden kann. Allerdings ist diese Reaktion nicht allein auf dieses Substrat beschränkt, auch andere Nukleophile wie z.B. Wasser können als Reaktionspartner fungieren (Abb. 1.24).^[81 - 85]

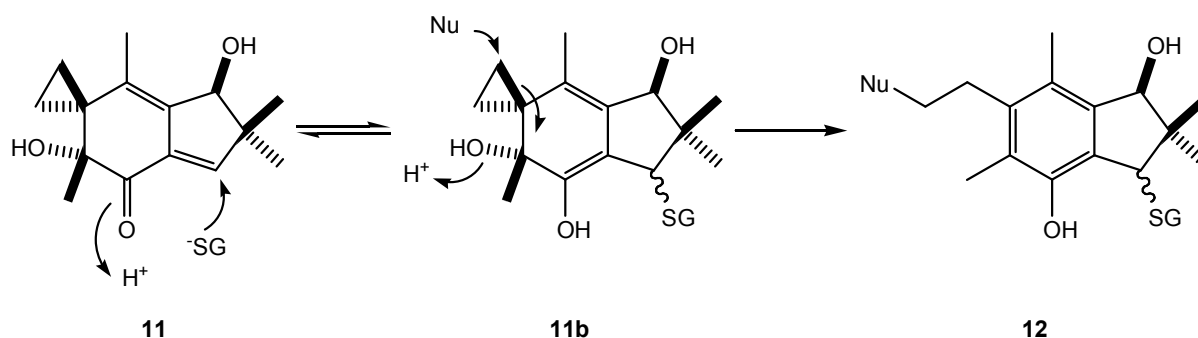


Abbildung 1.24: Reaktion von 11 mit Nukleophilen

Ein Thiol bindet an das C8 von **11** unter Bildung von Intermediat **11b**. Nach dieser Aktivierung kann ein Nukleophil (Nu) an den Cyclopropanring binden. Durch die nachfolgende Abspaltung der Hydroxylgruppe am C2 entsteht ein stabiler aromatischer Ring im Endprodukt **12**.^[82]

Als Folge der Bindung kommt es zu einer Abstraktion der Base mit anschließender Spaltung des Zuckerrückgrats, wie man sie analog auch bei den Losen beobachten kann (siehe Abb. 1.21).^[78, 79, 86] Die entstehenden Doppelstrangbrüche, führen zur Aktivierung eines breiten Spektrums an Reparaturproteinen und schlussendlich zu einem Anhalten des Zellzyklus über p53.^[86 - 88] Interessanterweise scheint die Behebung der DNA-Schäden dabei fast ausschließlich über TCR zu erfolgen.^[89] In präklinischen Studien zeigten **11** und **11a** zwar eine starke cytotoxische Aktivität, allerdings kommen sie aufgrund der hohen generellen Toxizität nicht für klinische Anwendungen in Betracht.^[90] Verantwortlich hierfür macht man die relativ schnelle Bindung an Thiole. Diese führt bei **11** bzw. **11a** zu einer vorzeitigen Aktivierung noch bevor eine Reaktion mit der DNA möglich ist. Durch die Bindung an Cysteine im ersten Reaktionsschritt werden zudem wichtige Proteine inhibiert. Einen besseren therapeutischen Index weist das von **11a** abgeleitete Derivat Hydroxymethylacylfulven oder auch Irofulven **11c** auf. Ursächlich hierfür ist, dass die anfängliche Aktivierung von **11c** nicht durch eine Reaktion mit Thiolen, sondern durch eine enzymatische Reduktion der Doppelbindung durch das Enzym AOR erfolgt. (siehe Abb. 1.25).^[86, 91 - 94] **11c** befindet sich gerade in Phase 2 der klinischen Tests. Untersucht wird dabei u.a. die Wirkung auf Ovarialkarzinome.^[95]

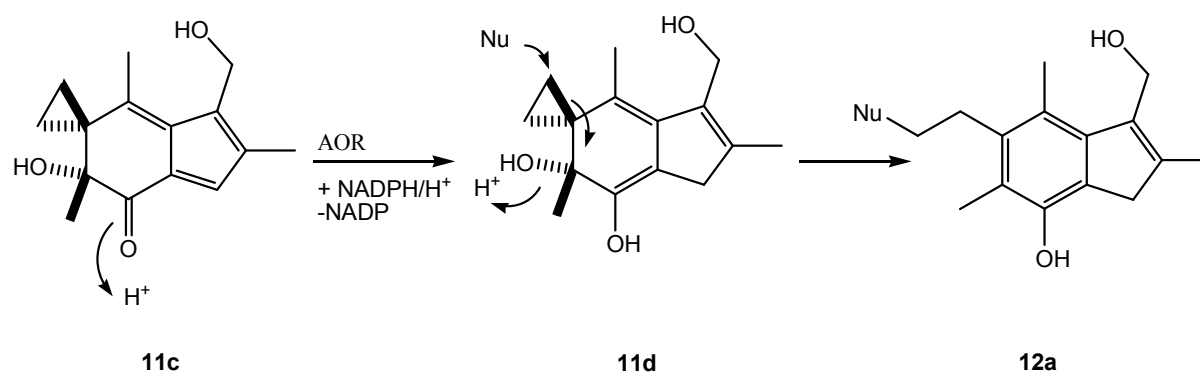


Abbildung 1.25: Reaktion von 11c mit Nukleophilen

Bei **11c** erfolgt die Aktivierung durch die Reduktion der Doppelbindung am C8 durch die AOR. Die nachfolgende Bindung des Nukleophils Nu an das Zwischenprodukt **11d** führt zur Bildung von **12a** und findet wie in Abb. 1.24 beschrieben statt.^[93]

1.3 Zielsetzung

Am Lehrstuhl Organische Chemie I der Universität Bayreuth versucht man in Anlehnung an bereits etablierte Cytostatika neue, wirkungsvollere Derivate zu entwickeln. In diesem Zusammenhang ist es notwendig, die Wirkung besagter Verbindungen zu untersuchen um festzustellen, welche sich für eine medizinische Anwendung eignen. Ziel der Arbeit war es, verschiedene Methoden hierfür zu etablieren. So sollten zum einen spezifische chemische Eigenschaften, wie die Stabilität von Esterbindungen, das Alkylierungspotential oder die Reaktivität von Illudinderivaten gegenüber Thiolen, evaluiert werden. Zum anderen sollten gängige Verfahren zur Untersuchung von Apoptose, wie Immunoblot, TUNEL- und Annexin-Test, so angepasst werden, dass sie für die Analyse der am Lehrstuhl hergestellten Verbindungen zur Verfügung stehen. Darüber hinaus sollten mit Hilfe des CAM-Assays mögliche antivaskuläre Eigenschaften festgestellt werden. Damit Illudin M **11** als Ausgangsverbindung für Derivatisierungen auch in ausreichender Menge zur Verfügung steht, sollte zudem die biotechnische Gewinnung dieser Substanz optimiert werden. Hierfür wurde eine analytische Methode zur Quantifizierung entwickelt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät (Zellkultur)	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 135S	H+P
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus
Clean Bench	AURA Vertical S.D.4	Nunc
Einfrierkammer	5100 Cryo 1° C Freezing Container, „Mr. Frosty“	Nalgene
Gefrierschrank (-80° C)	VX 490 E	Jouan
Kühl- & Gefrierschrank	öko	Privileg
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Brand
Stickstoffdewar	GT38	Deutsche Air Liquide
Tischzentrifuge	Mini-Spin	Eppendorf
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Thermo
Zentrifugenrotor	Nr. 5148	Haereus

Fermenterbauteil	Typ	Hersteller
Aquariumpumpe	Eheim 400 TetraTec APS 400	Eheim Tetra
Ballonflasche		Nalgene
Magnetheizrührer	IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel IKA- Labortechnik

Gerät (Analytik)	Typ	Hersteller
Bio-Imaging-System	LAS 4000	Fujifilm
<i>Zugehöriges Programm</i>	ImageReader für LAS 4000	
Elektrophorese- und Blottingkammer	MAXI vertikal	Roth

Materialien und Methoden

Fluoreszenzmeßgerät	SFM 25	Kontron
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiovert 135, Filterset 02/44, AxioCam MRc5	Zeiss
<i>Zugehöriges Programm</i>	Axiovision	
HPLC- Anlage	System Gold, Programmable Solvent Module 125 Diode Array Detector Module 168	Beckmann
<i>Zugehöriges Programm</i>	32 Karat	
HPLC-Säule	Ultrassep ES 100 RP18 6 µm	Bischoff Chromatography
Massenspektrometer	MAT-8500	Thermo Finnigan
NMR	DRX-300	Bruker
<i>Zugehöriges Programm</i>	SpinWorks 2.5	
Röntgenfilm-Entwickler	Medical Film Processor Modul SRX-101	KONICA
Quarzküvette	Typ Nr. 108.002-OS	Hellma
Quarzküvette (für Fluoreszenzmessungen)	Typ 23	Starna
Spektrometer	UV 160 A	Shimadzu
Stromquelle	2197 Power Supply	LKB Bromma
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Transilluminator	Bioprint DS	LTF Labortechnik
<i>Zugehöriges Programm</i>	Biocapt	

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank (CAM-Assay)	umgebauter Heizschrank	Memmert
Magnetheizrührer	IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel IKA- Labortechnik
Schüttler	SM 25 Polymax 1040	Edmund Bühler Heidolph
Ultraschallbad/Wasserbad	Sonorex super 10P	Bandelin
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel IKA- Labortechnik

Nicht weiter aufgeführt sind Kolben und andere Glasgeräte aus hauseigener Quelle.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien**Gegenstand**

Aluminiumfolie
 Blottingpapier
 Chamber Slides
 Cryotubes
 Faltenfilter
 Glasschale
 Greiner Tubes
 Gummiband
 DC-Plättchen
 Eppendorfreaktionsgefäße
 Kaffeebecher
 Kanülen
 Kunststofffolie
 Objektträger
 Pasteuer-Pipetten
 Petrischalen
 Petrischalen aus Glas
 pH-Papier
 kleine Plastikbecher
 PVDF-Membran
 Röntgenfilm
 Rundfilter
 Silikonring
 Sterilfilter
 Zellkulturflaschen
 Zellstoffplättchen
 Zentrifugenfilter (Ultrafree-MC)
 6-Well Mikrotiterplatten
 Deckgläschen
 Serologische Pipetten

Quelle

Hauseigene Quelle
 Roth
 Nunc
 VWR
 Roth
 Haushaltswarengeschäft
 VWR
 Haushaltswarengeschäft
 Macherey-Nagel
 Sarstedt
 Haushaltswarengeschäft
 Hauseigene Quelle
 Haushaltswarengeschäft
 Hauseigene Quelle
 Hauseigene Quelle
 Sarstedt
 Hauseigene Quelle
 Merck
 Haushaltswarengeschäft
 Roth
 GE Healthcare
 Roth
 Hauseigene Quelle
 Roth
 Nunc
 Oxoid
 Millipore
 VWR
 Hauseigene Quelle
 Roth

2.1.3 Organismen

Organismus	Quelle
<i>Omphalotus olearius</i> DSM 3398	DSMZ
<i>Pleurotus japonicus</i> ATCC 20195	DSMZ
HL60	DSMZ
518 A2	Biozentrum Halle, Dr. R. Paschke
Kb-V1	Universität Regensburg, Prof. Dr. G. Bernhardt
MCF-7	Universität Regensburg, Prof. Dr. G. Bernhardt
HT-29	Universität Erlangen, Prof. Dr. M. Ocker
Hühnereier	Bauernhof Tanner, Eckersdorf

2.1.4 Chemikalien

Substanz (Zellkultur)	Quelle
Antibiotic-Antimycotic	Gibco
DMEM	Gibco
EMEM	Sigma
FBS	Gibco
Gentamycin	Serva
Natriumpyruvat	Fluka
RPMI 1640	Gibco
Trypsin-EDTA	Gibco

Substanz (Pilzkultur)

Corn-steep solids
 Corn-steep liquor
 Glucose-Monohydrat
 Glucose
 Hefeextrakt
 Malzextrakt
 Natriumglutamat Monohydrat
 Sojapepton
 Sabouraud-2%-Glucose-Agar
 Stärke
 Trockenhefe
 L-Valin

Quelle

Sigma
 Sigma
 Grüssing
 Riedel-de Häen
 Roth
 Roth
 Fluka
 Fluka
 Roth
 Merck
 Sigma
 Merck

Life Science-Produkte

Bradford-Fertiglösung
 Bovine Serum Albumin (BSA)
 ECL-Substrat (Roti[®]-Lumin 1 und 2)
 Milchpulver
 MK 571
 Protease Inhibitor (Cocktail Set III)
 Roti[®]-Load 1
 Röntgenfilm-Entwicklerlösung
 Röntgenfilm-Fixierlösung
 Topotecan
 Vinblastin

Quelle

Sigma
 Roth
 Calbiochem
 Roth
 Sigma
 Calbiochem
 Roth
 Ilford
 Ilford
 Molekula
 Calbiochem

Antikörper:

Primär: Anti-*Caspase-9* (Ab-2) Mouse mAb (1-2)
 Sekundär: Goat Anti-Mouse igG, H&L Chain Specific
 Peroxidase Conjugat

Calbiochem
 Calbiochem

Materialien und Methoden

Proteinmarker:

Precision Plus Protein™ Standard All Blue	Bio-Rad
Roti®-Mark-BICOLOR	Roth

Testkits:

Annexin-Testkit: Annexin-V-FLUOS	Roche
TUNEL-Testkit: <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche

Substanz (organisch)

Quelle

Acrylamid/bis	Serva
APS	Roth
Benzylbromid	Merck
Catechin	Fluka
Collagen	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
EDTA	VWR
Epichlorhydrin	Merck
Essigsäure	Fluka
Estradiol	Alfa Aesar
Formaldehydlösung (35%)	Riedel-de Häen
Glutathion	Merck
Glycin	Roth
Natriumacetat	Grüssing
Natriumcitrat	Roth
Nicotinamid	Merck
Paraformaldehyd	Merck
SDS	Roth
TEMED	Merck
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 80	Roth

Tween 20

Sigma

XAD16

Sigma

Substanz (anorganisch)

Quelle

Cisplatin

Sigma

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Fluka

MgCl_2

Fluka

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Merck

MnCl_2

Fluka

NaCl

Riedel-de Häen, Grüssing

NaHCO_3

Merck

NaNO_3

Merck

NaOH

Riedel-de Häen

Na_2SO_3

Roth

Na_2SO_4

Roth

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Fluka

NiCl_2

Fluka

KCl

Merck

KH_2PO_4

Merck

KOH

VWR

$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Riedel-de Häen

$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$

Merck

Seesand

Grüssing

Silicagel

Macherey-Nagel

Lösungsmittel

Quelle

Aceton

Hauseigene Quelle

n-Butanol

Riedel-de Häen

CDCl_3

Euriso-Top

Chloroform

Hauseigene Quelle

Diethylether

Hauseigene Quelle

DMF

VWR

Materialien und Methoden

DMSO	Fisher Scientific
Essigsäureethylester	Hauseigene Quelle
n-Hexan	Hauseigene Quelle
Isopropanol	Hauseigene Quelle
Methanol	Sigma-Aldrich
Pentan	Hauseigene Quelle
Wasser (Aqua bidest.)	Hauseigene Quelle
Wasser (VE-Wasser)	Hauseigene Quelle

Gas/Flüssiggas

Argon	Hauseigene Quelle
flüssiger Stickstoff	Hauseigene Quelle

Quelle

2.1.5 Testssubstanzen

In Abb. 2.1 bis 2.16 sind die Strukturformeln aller untersuchten Substanzen aufgeführt. Zur besseren Übersicht wurden sie gemäß ihrer strukturellen Komponenten in verschiedene Unterkategorien aufgeteilt. Die Reihenfolge innerhalb der einzelnen Gruppen wurde anhand struktureller Gemeinsamkeiten festgelegt. Die Verbindungen waren von Dr. Bernhard Biersack bzw. Dipl.-Chem. Sebastian Seibt synthetisiert worden. Catechin **25** war käuflich erworben worden und das Naphtochinon **30** stammte von Dr. Sandra Breyer.

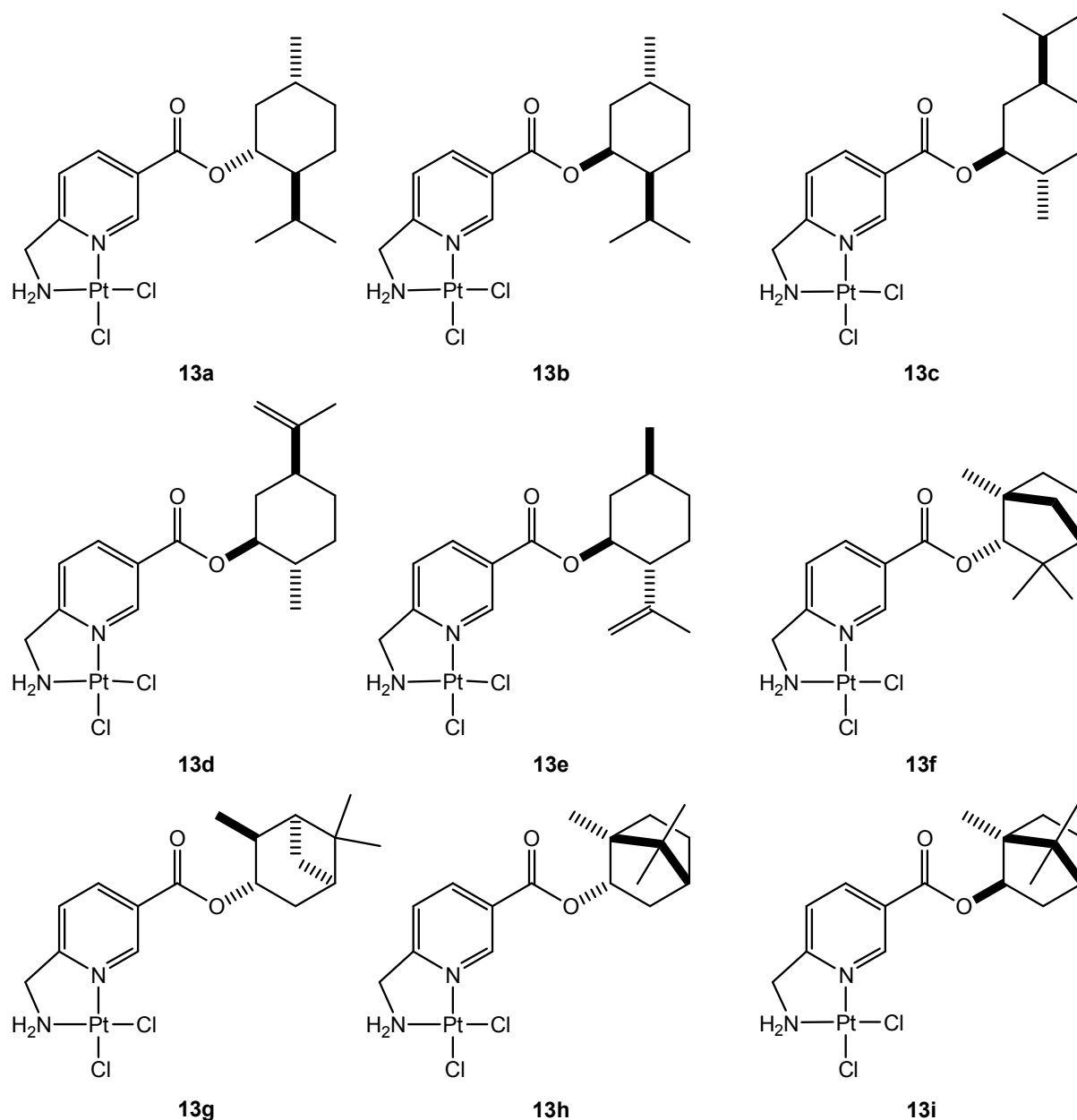


Abbildung 2.1: Platinkomplexe mit Terpenkomponenten

In der Abbildung sind die Strukturformeln verschiedener Testsubstanzen zu sehen. Hierbei handelt es sich um (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexe, an die über eine Esterbindung verschiedene Terpene gekoppelt sind. Diese sind (+)-Menthol (**13a**), Neomenthol (**13b**), Carvomenthol (**13c**), Dehydrocarveol (**13d**), Isopulegol (**13e**), Fenchol (**13f**), 3-Pinanol (**13g**), Borneol (**13h**) und Isoborneol (**13i**).^[96 - 99]

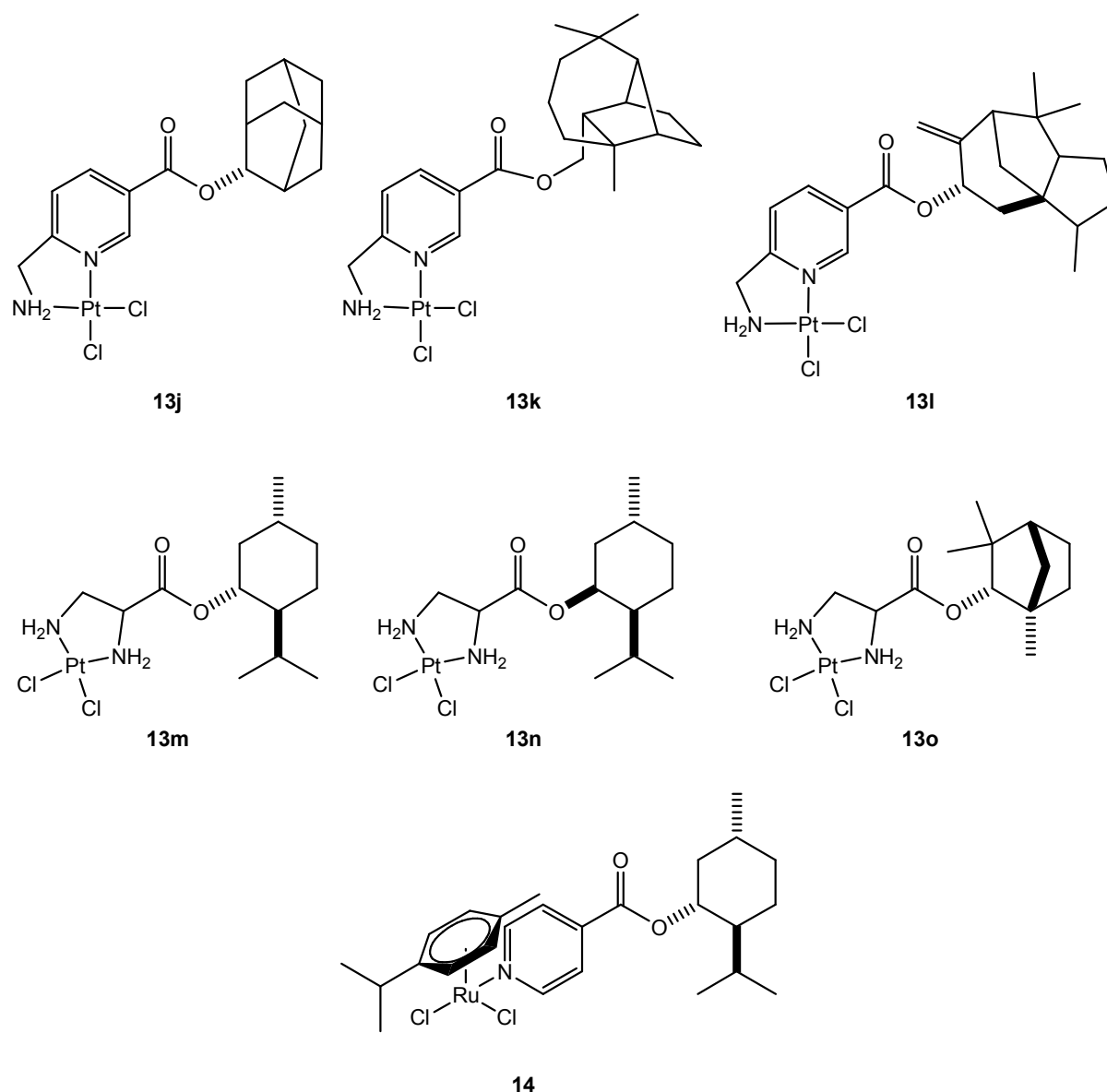


Abbildung 2.2: Metallkomplexe mit Terpene

Bei den Testverbindungen **13j** bis **13l** handelt es sich um (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexe, bei den Testverbindungen **13m** bis **13o** um Platin-Diaminopropionsäure-Komplexe, an die verschiedene Terpene gebunden sind. Diese Terpene sind Adamantol (**13j**), Isolongifolol (**13k**), Cedrenol (**13l**) sowie (+)-Menthol (**13m**), Neomenthol (**13n**) und Fenchol (**13o**). **14** ist ein Ester aus (+)-Menthol und einem [Dichlorido(isonicotinat) *p*-Cymen]ruthenium-Komplex.^[96 - 99]

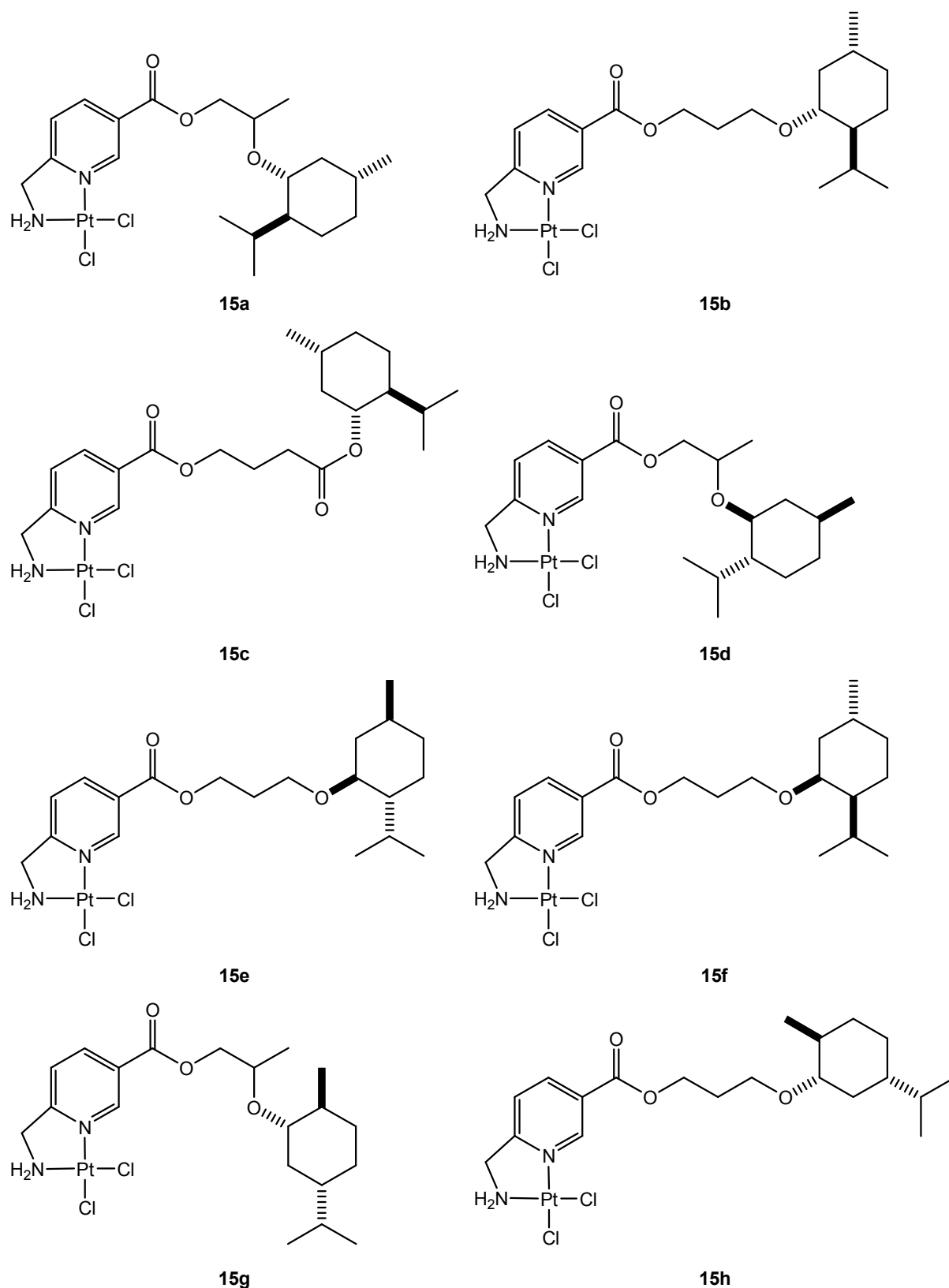


Abbildung 2.3: Platinkomplexe mit Linkern und Terpenkomponenten

Bei den in der Abbildung dargestellten Testsubstanzen handelt es sich um (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexe, an die über verschieden lange Kohlenstoffketten Terpenkomponenten gebunden sind. Bei den Terpenen handelt es sich hierbei um verschiedene Isomere des Menthols, (-)-Menthol bei **15a** bis **15c**, (+)-Menthol bei **15d** und **15e**, Neomenthol bei **15f** und Carvomenthol bei **15g** und **15h**.^[96 - 99]

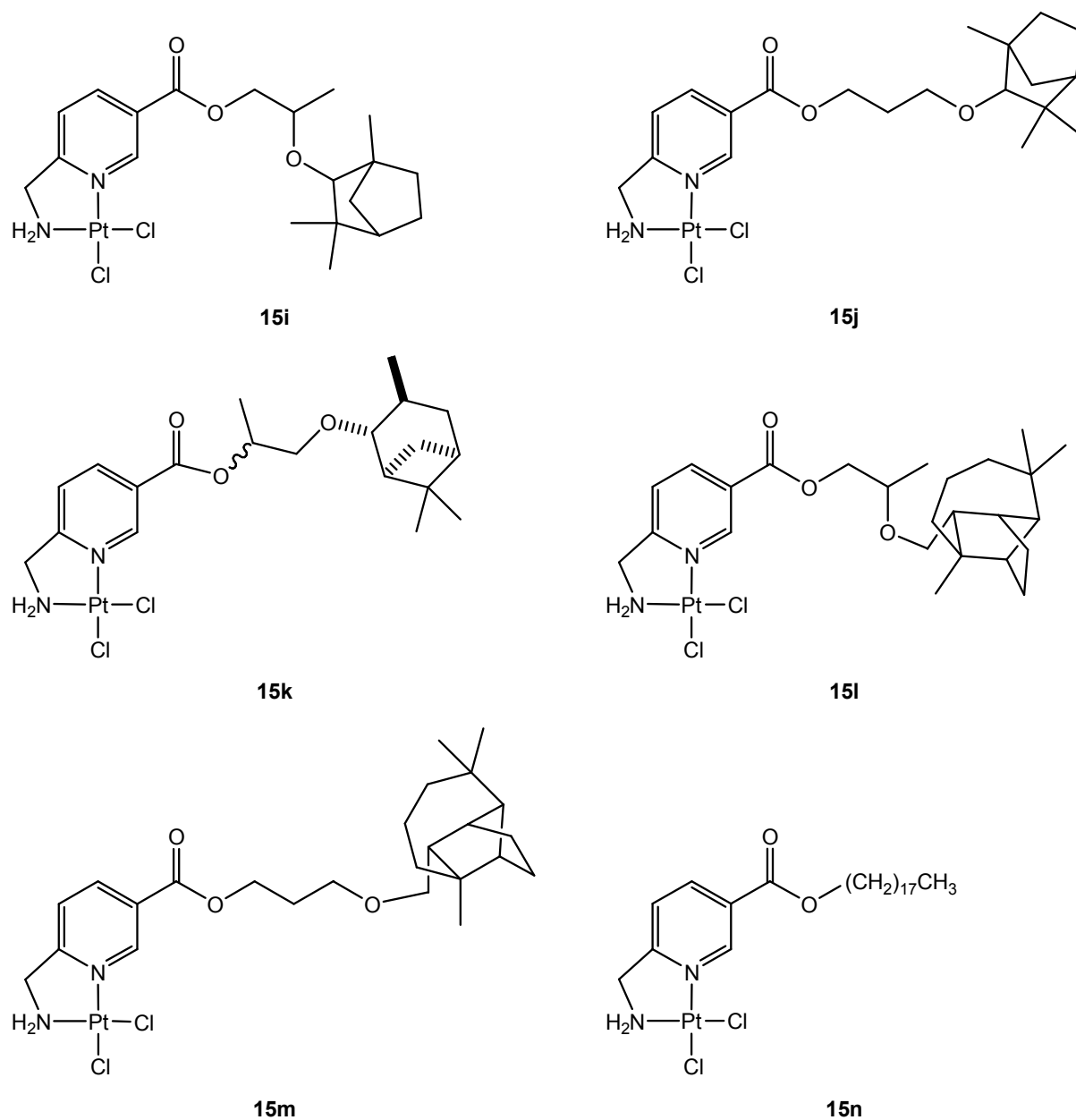


Abbildung 2.4: Platinkomplexe mit Linkern und Terpenkomponenten

Auch bei diesen Testverbindungen ist der (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplex über einen Linker an verschiedene Terpene gekoppelt. Diese sind Fenchol (**15i** und **15j**), 3-Pinanol (**15k**) und Longifolol (**15l** und **15m**). Bei **15n** erfolge die Kopplung des Komplexes an Octadecanol.^[96 - 99]

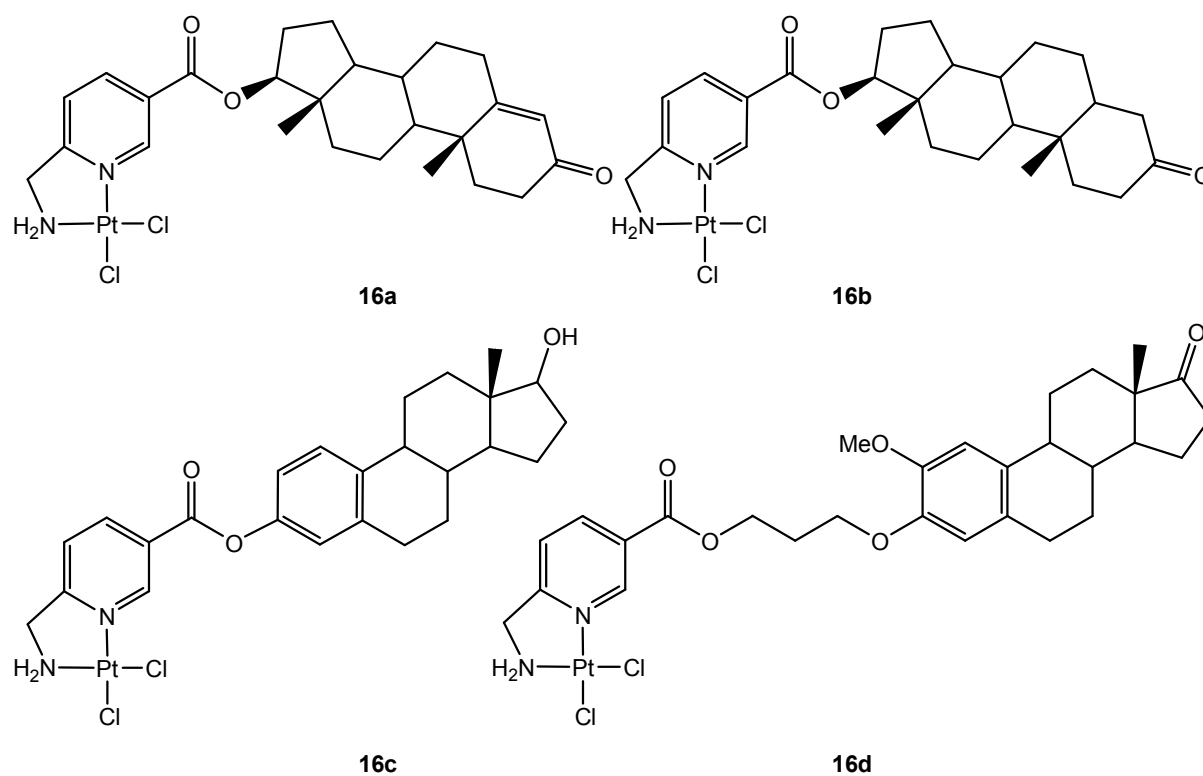


Abbildung 2.5: Platinkomplex-Steroidkonjugate

Dies sind Konjugate aus einem (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplex und den Steroiden Testosteron (**16a**), Dihydrotestosteron (**16b**), Estradiol (**16c**) und 2-Methoxy-Estron (**16d**).^[96, 100, 101]

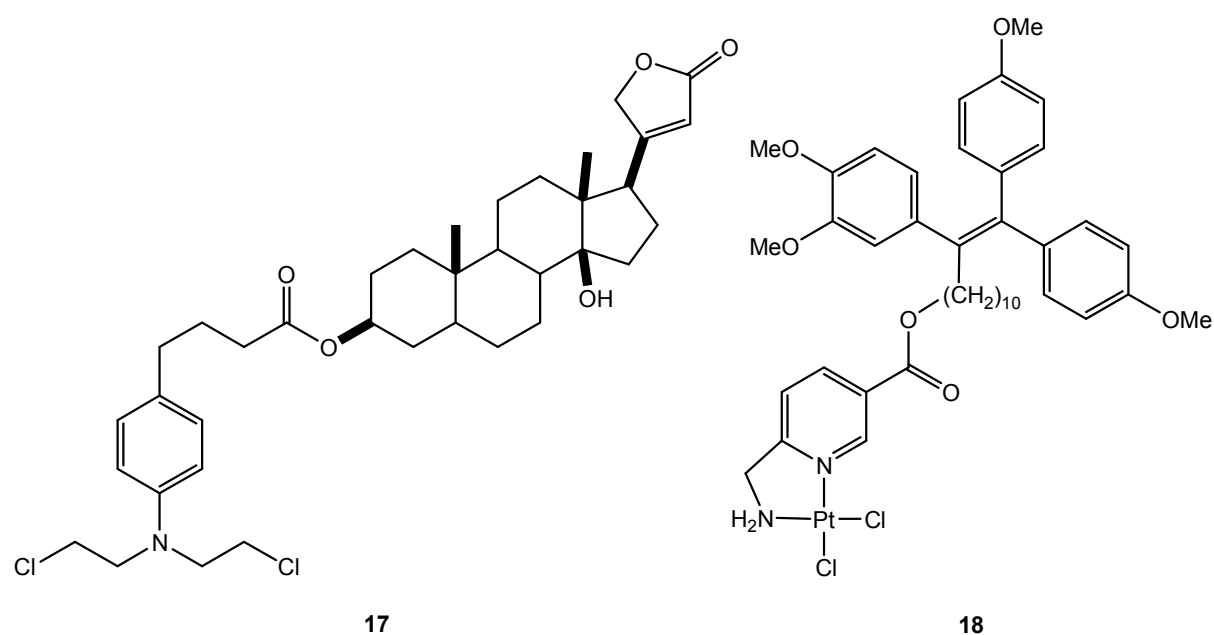


Abbildung 2.6: Hormonkonjugate

17 ist ein Ester der Effektorkomponenten Digitoxigenin und Chlorambucil, **18** ein Platinkomplexkonjugat mit dem Tamoxifen-derivat 11-(3'',4''-Dimethoxyphenyl)-12-di(4'-Methoxyphenyl)-11-dodecenol.^[96, 100, 101]

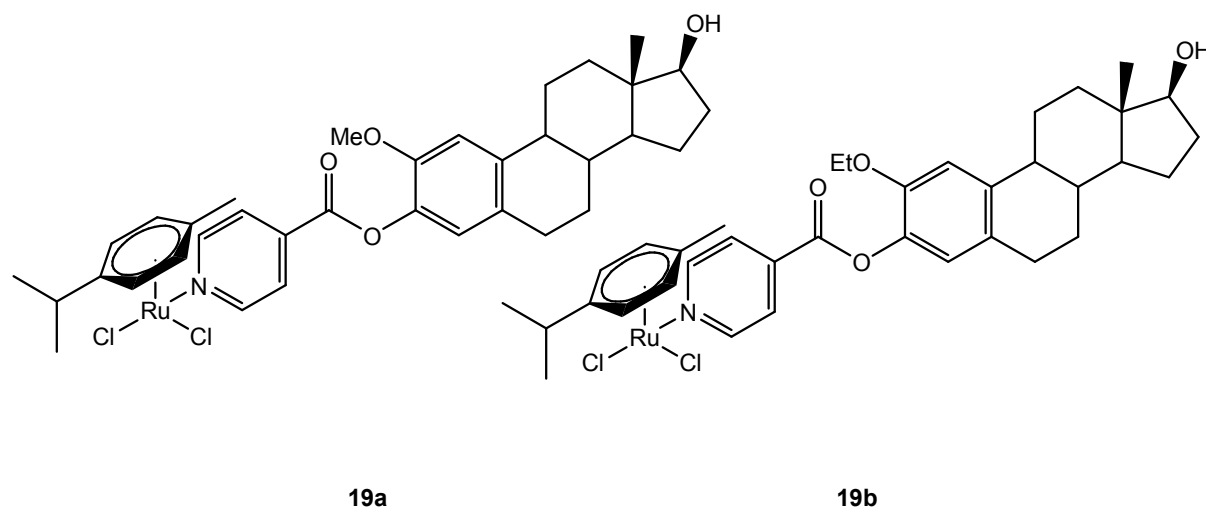


Abbildung 2.7: Rutheniumkomplex-Steroidkonjugate

Die Testsubstanzen in dieser Abbildung sind Steroidhormone, 2-Methoxy-Estradiol (**19a**) und 2-Ethoxy-Estradiol (**19b**), die mit einem [Dichlorido(isonicotinat) *p*-Cymen]ruthenium-Komplex gekoppelt sind.^[102]

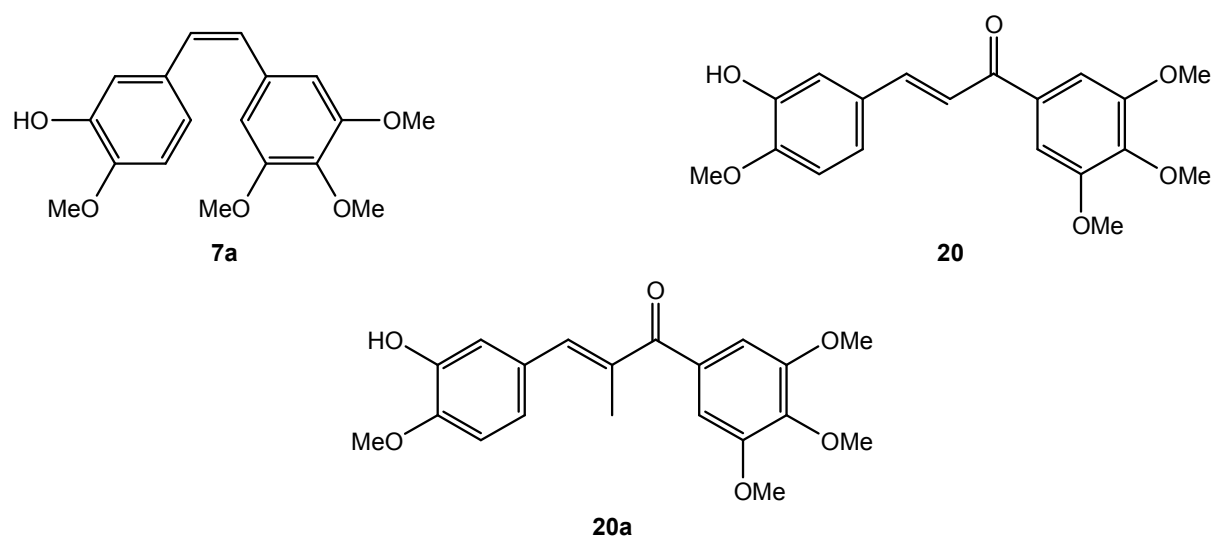


Abbildung 2.8: Chalkone und Stilbene

Stilben **7a** ist der Naturstoff Combretastatin A-4. Das Chalkon 3-(4'-Methoxy-3'-hydroxyphenyl)-1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-propenon **20** ist ein bekannter Tubulinligand, **20a** sein 2-methyliertes Analogon.^[96, 103, 104]

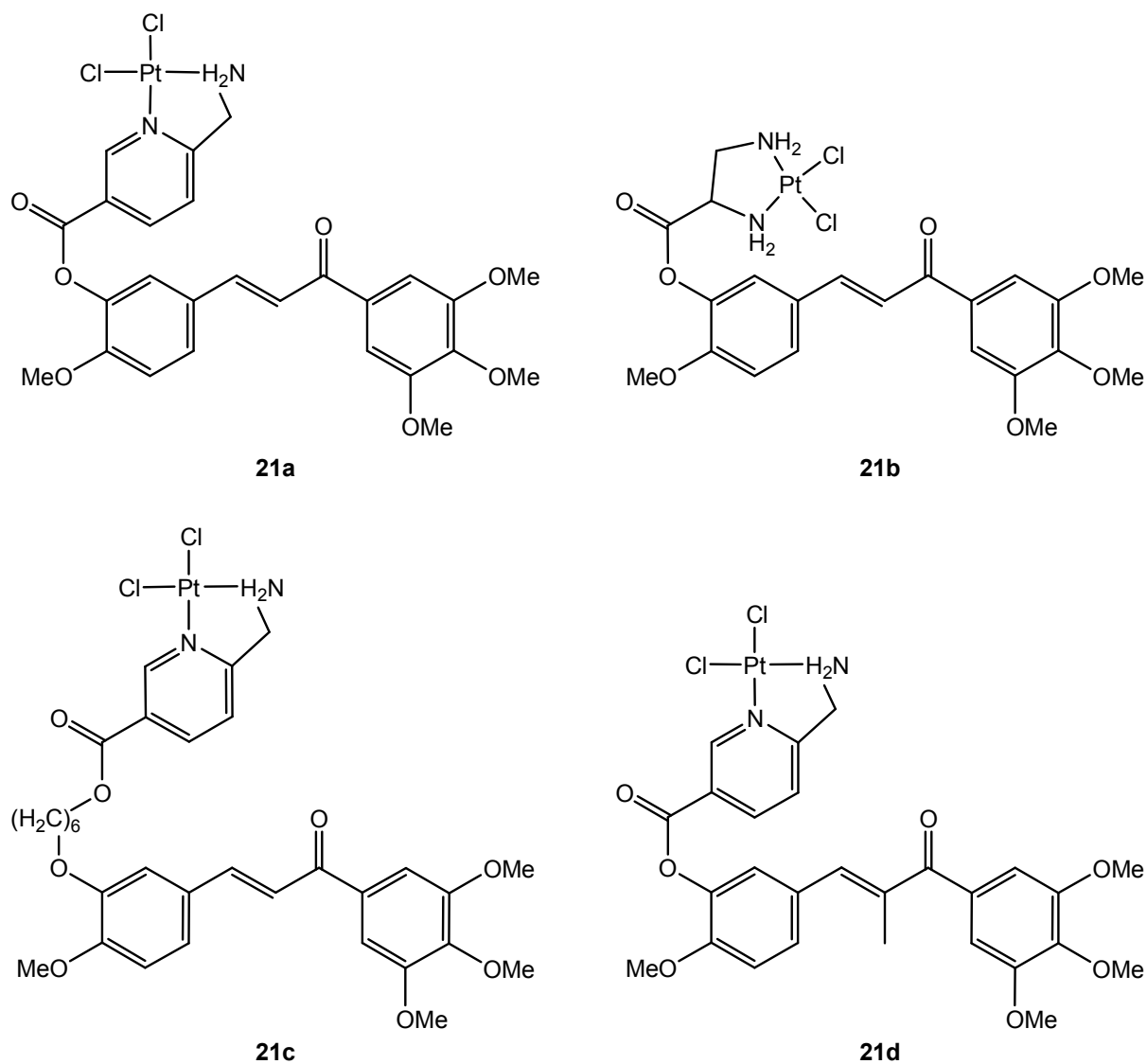


Abbildung 2.9: Chalkone und Stilbene

21a ist der Ester von **20** mit einem (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplex, **21b** ist der Ester von **20** mit einem Platin-Diaminopropionsäure-Komplex und bei **21c** ist der (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplex über den Linker 1,6-Hexandiol an **20** gebunden. **21d** ist der Ester von **20a** mit dem (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplex.^[96, 103, 104]

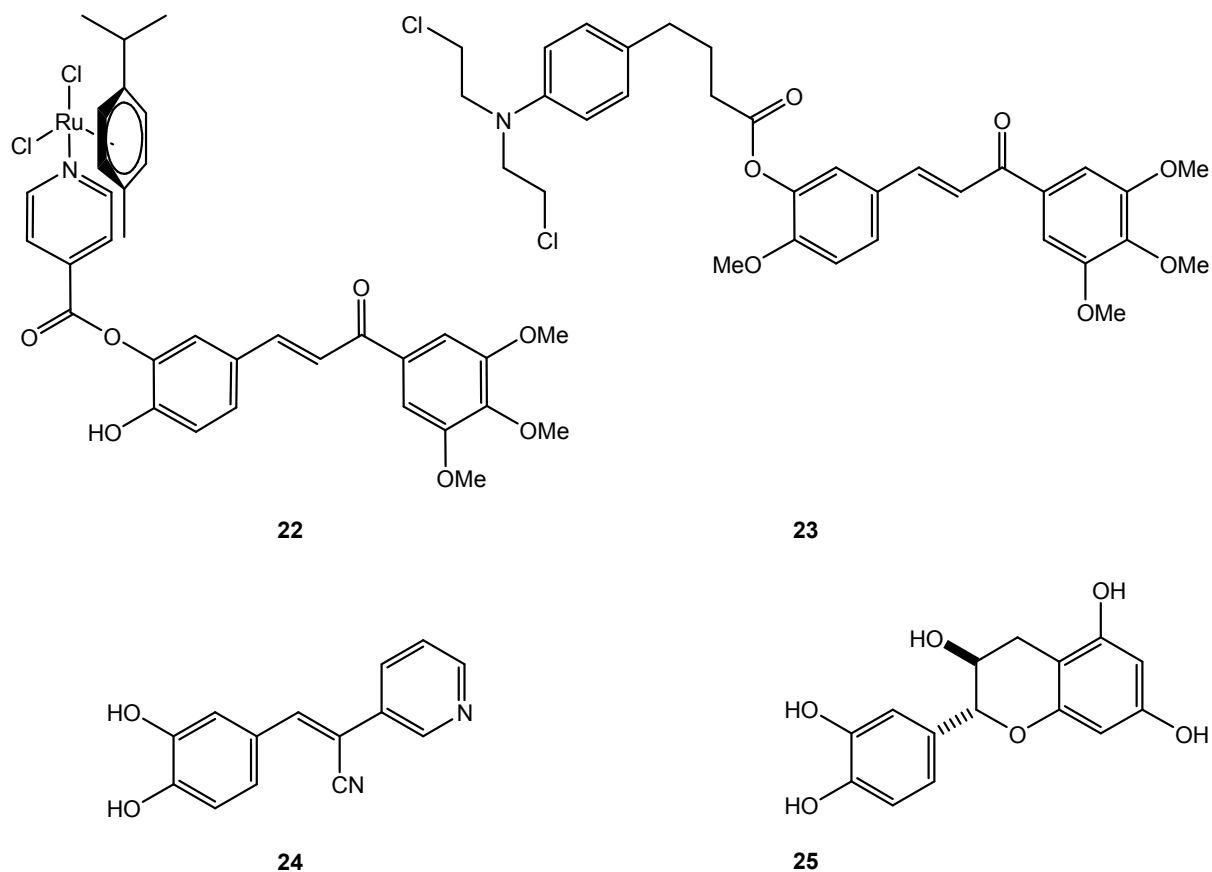


Abbildung 2.10: Weitere Chalkone und ähnliche Verbindungen

Ester **22** ist ein Konjugat von **20** mit einem [Dichlorido(isonicotinat) *p*-Cymen]ruthenium-Komplex, Ester **23** eines mit dem Alkylanz Chlorambucil. 3-(1'-Cyano-2'-(3'',4''-dihydroxyphenyl)-2-ethenyl)-pyridin **24** und Catechin **25** sind weiter vom Grundgerüst entfernt, werden aber auch dieser Substanzklasse zugeordnet.^[96, 103, 104]

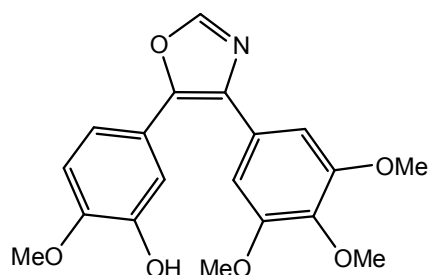
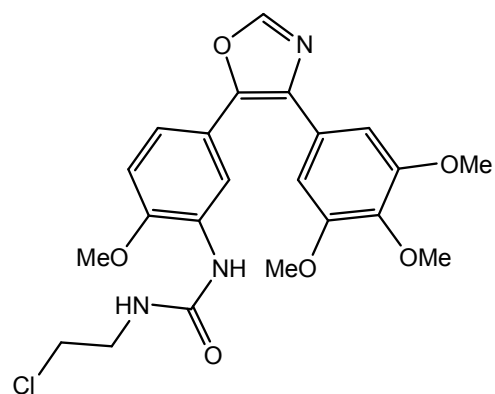
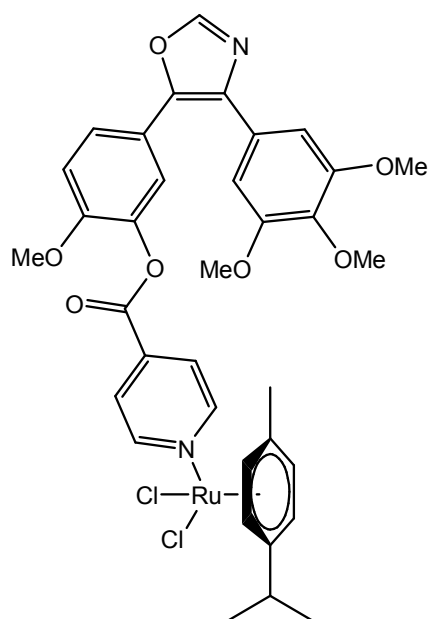
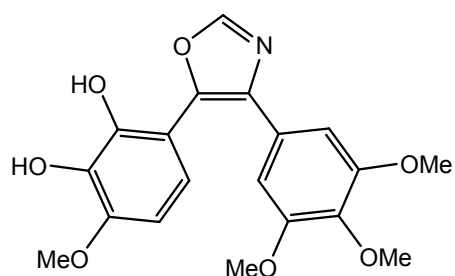
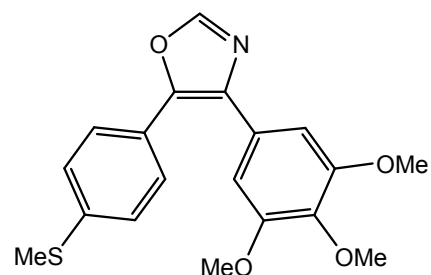
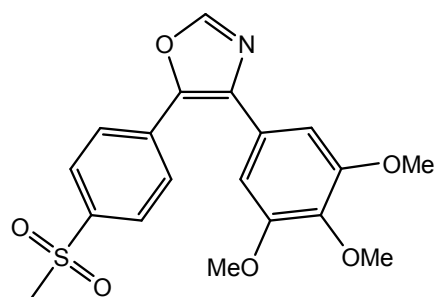
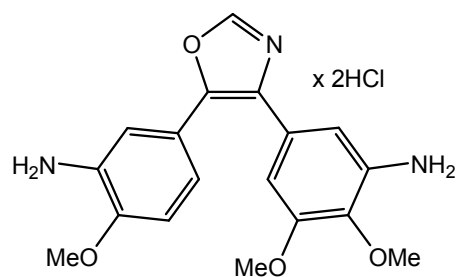
**26a****26b****26c****26d****26e****26f****26g**

Abbildung 2.11: Combretastatin A-4-analoge Oxazole

Das Grundgerüst der Testsubstanzen in dieser Abbildung ist 5-(3''-Hydroxy-4''-methoxyphenyl)-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-oxazol **26a**. Dieses leitet sich ebenfalls von **7a** ab (vgl. Abb. 2.8). **26b** ist das Amid mit N-(2-Chlorethyl)-Harnstoff, **26c** ein Ester mit einem [Dichlorido(isonicotinat) *p*-Cymen]ruthenium-Komplex. **26d** ist das 2''-Hydroxyderivat von **26a**. **26e** ist 5-(4''-Methylsulfanyl)-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-oxazol, **26f** das davon abgeleitete Sulfon. **26g** ist 5-(3''-Amino-4''-methoxyphenyl)-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-oxazol.^[96, 105 - 108]

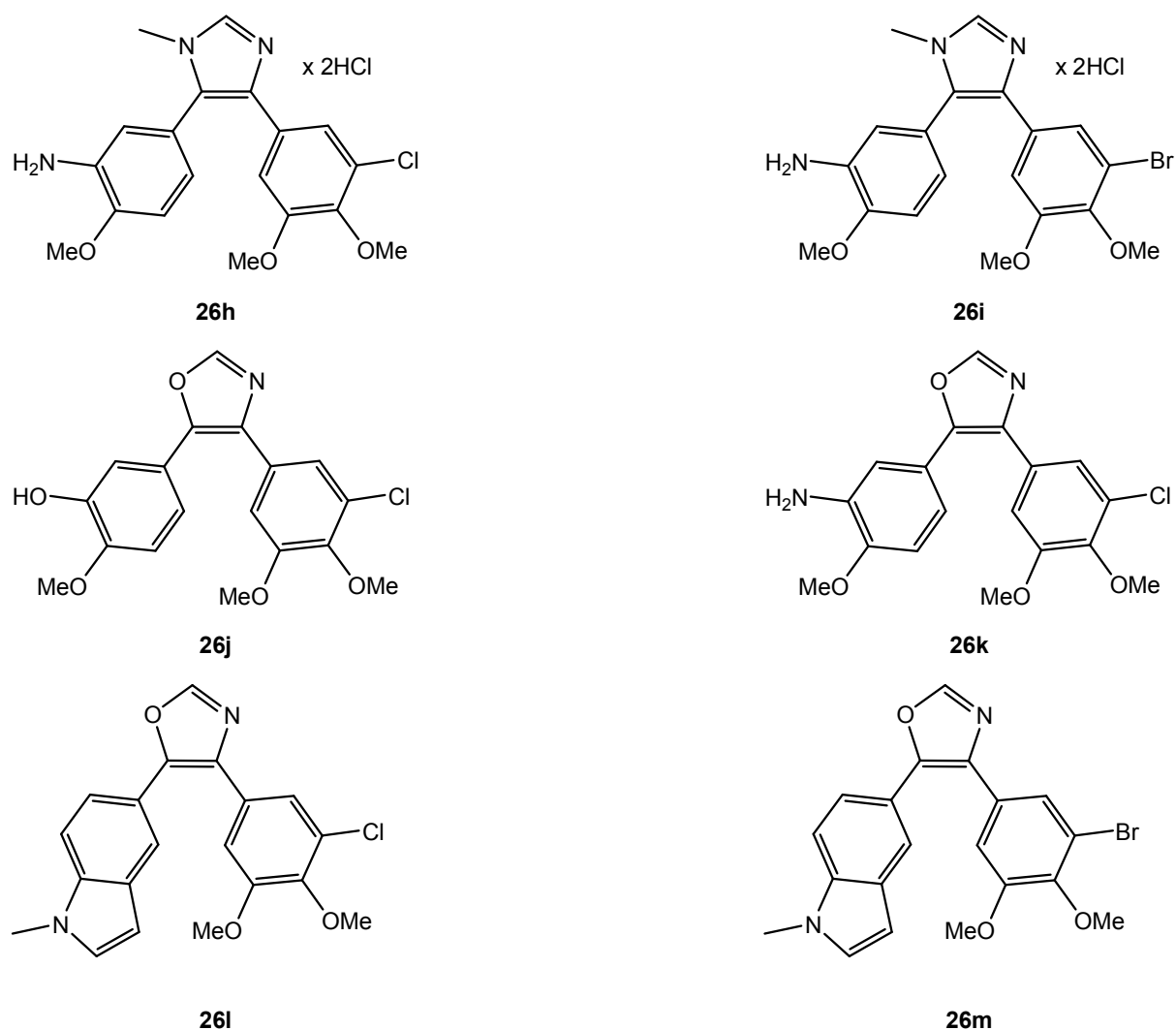


Abbildung 2.12: halogenierte Combretastatin A-4-analoge Imidazole und Oxazole

Zu sehen sind 5-(3''-Amino-4''-methoxyphenyl)-4-(3'-chloro-4',5'-dimethoxyphenyl)-imidazol **26h**, das bromhaltige Analogon **26i**, 5-(3''-Hydroxy-4''-methoxyphenyl)-4-(3'-chlor, 4', 5'-dimethoxyphenyl)-oxazol **26j** und das 3''-Amino-Analogon **26k** sowie 4-(3'-Chloro, 4',5'-dimethoxyphenyl)-5-(N-methylindol-5''-yl)-oxazol **26l** und dessen bromhaltiges Analogon **26m**.^[96, 105 - 108]

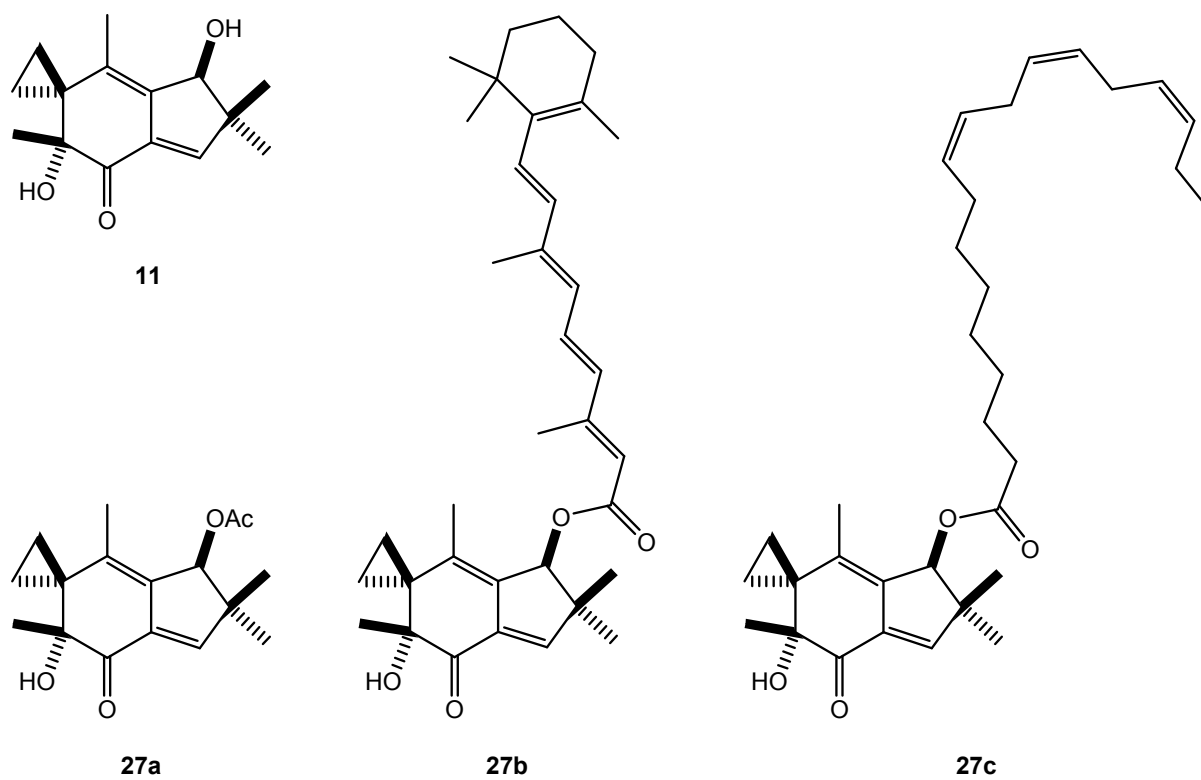


Abbildung 2.13: Illudin M (11) und die Monoester 27a bis 27c

27a ist der Acetyler, **27b** der Retinsäureester und **27c** ist der α -Linolensäureester von Illudin M **11**.^[96, 109]

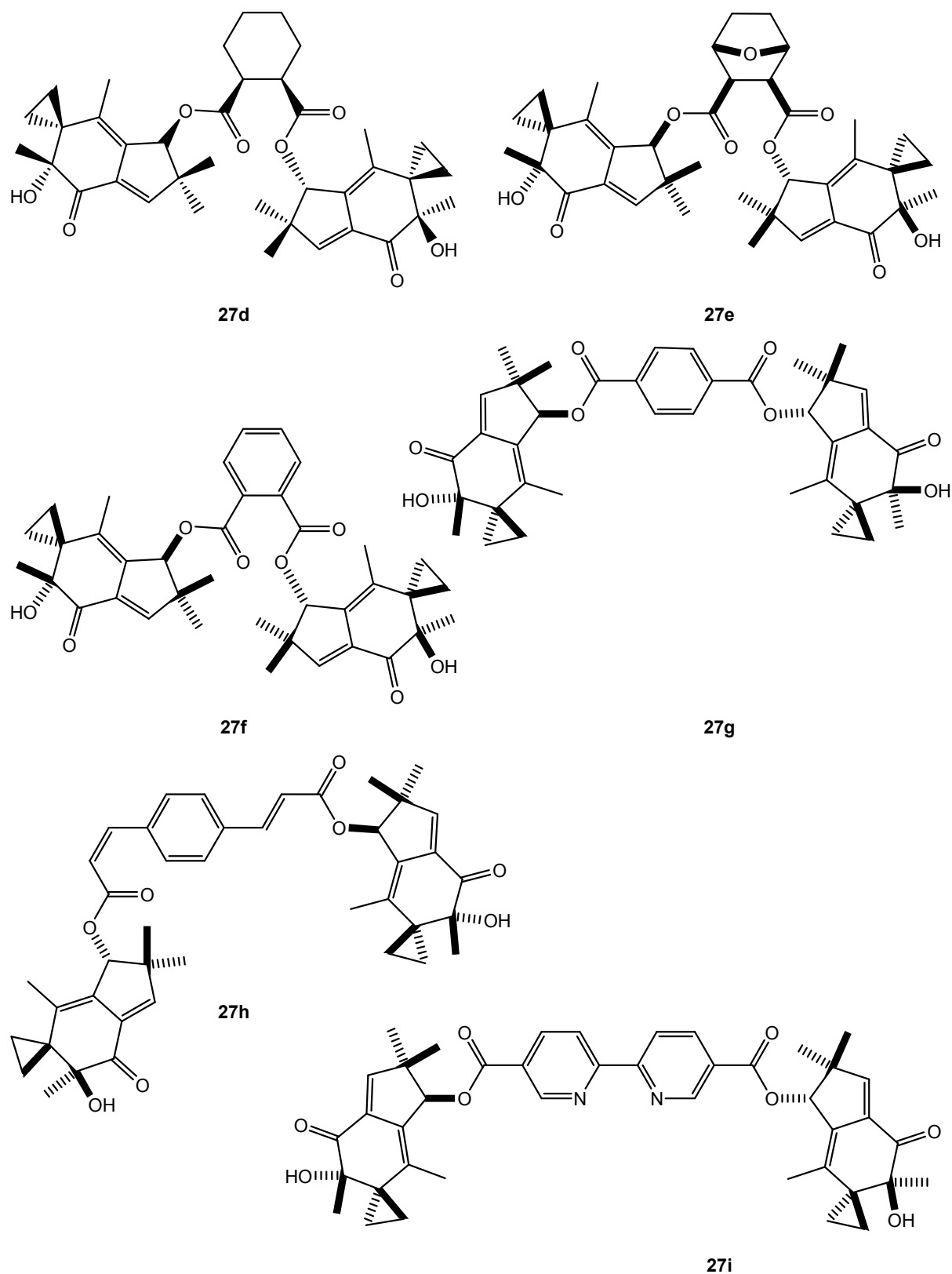


Abbildung 2.14: Metallfreie Bis(illudinyl(M))dicarboxylate

Die verwendeten Disäuren sind Cyclohexan-1,2-Disäure (**27d**), Demethylcanthridin (**27e**), Pthalsäure (**27f**), Terephthalsäure (**27g**), Bisacrylsäure (**27h**) und 2,2'-Bipyridin-4,4'-Disäure (**27i**).^[96, 109]

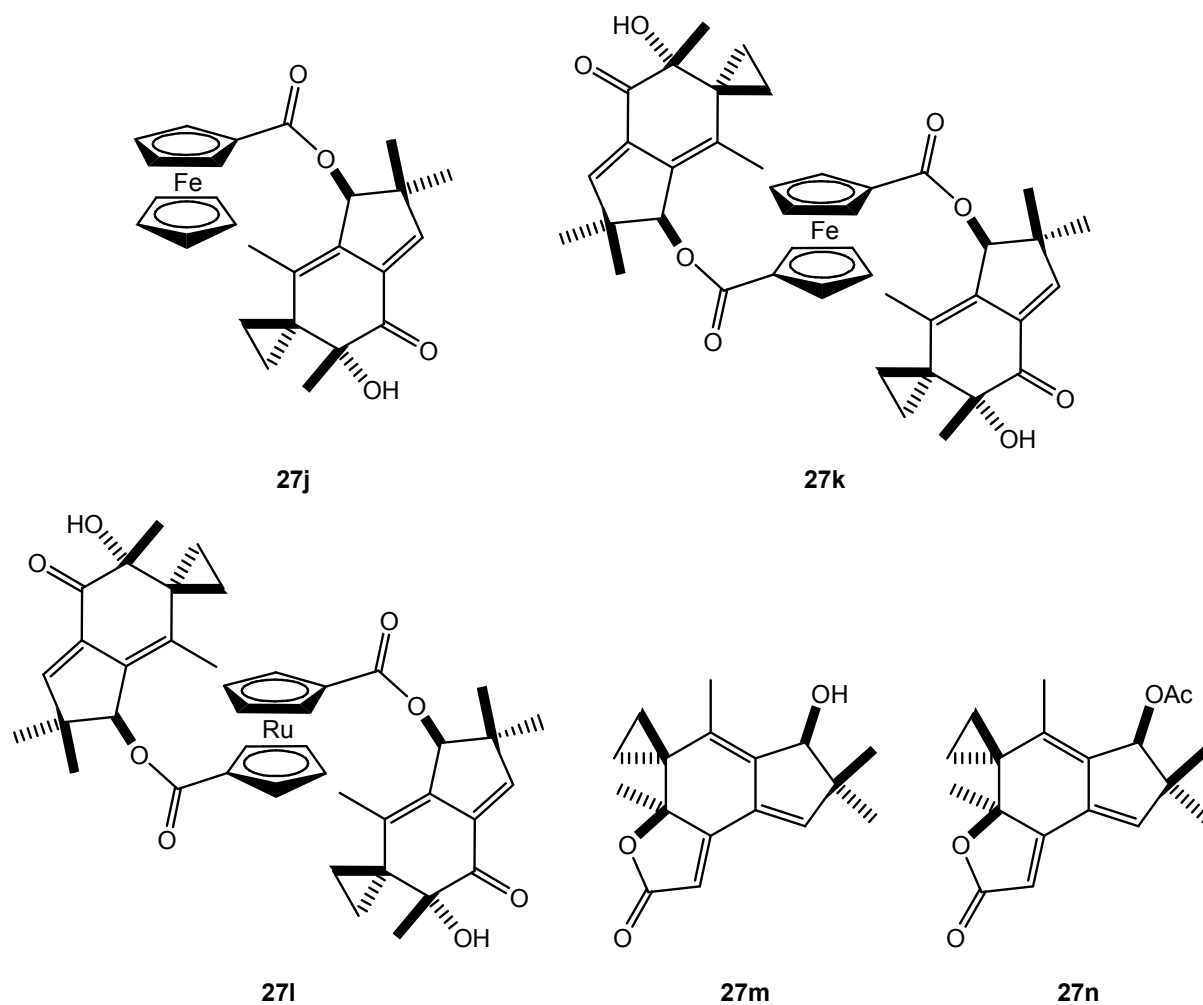


Abbildung 2.15: Weitere Illudin-Derivate

Die Substanzen sind Esterkonjugate von **11** mit Ferrocensäure (**27j**), Ferrocendisäure (**27k**) und Ruthenocendisäure (**27l**). **27m** und **27n** sind Lactone, die sich von **11** bzw. **27a** ableiten.^[109 - 111]

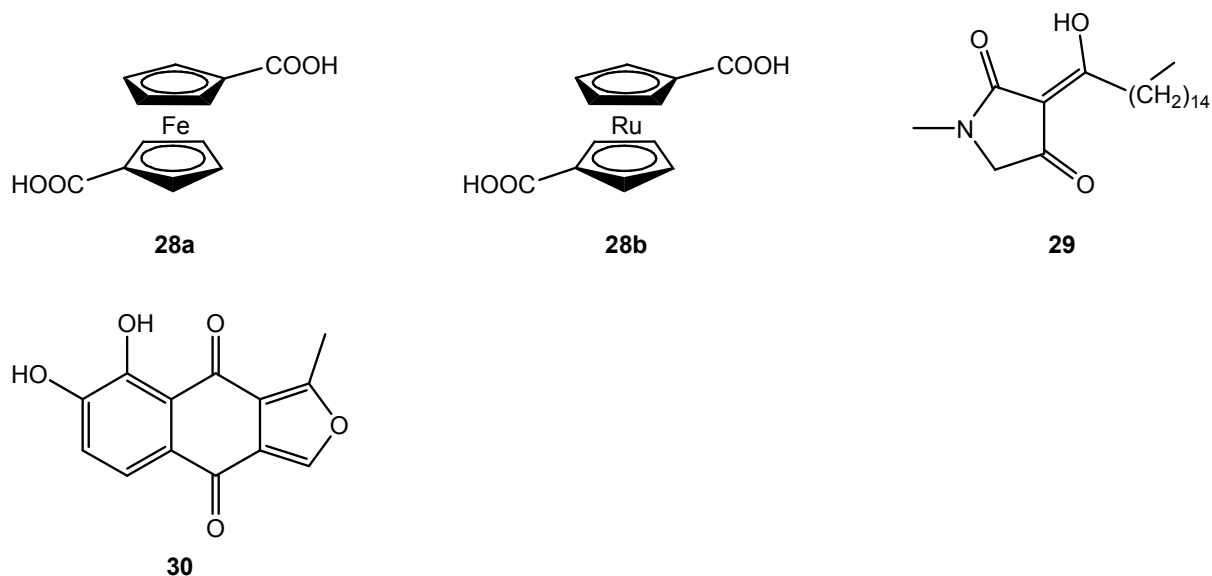


Abbildung 2.16: Verbindungen zur Metallkomplexierung

Ferrocendisäure **28a** und Ruthenocendisäure **28b** sind die Edukte bzw. potentiellen Hydrolyseprodukte der Konjugate **27j**, **27k** und **27l**. Melophlin A **29** und 7,8-Dihydroxy-1-methylnaphto[2,3-c]furan-4,9-dion **30** sind Metallchelatoren natürlichen Ursprungs.^[96, 110, 112 - 114]

Die eingesetzte Konzentration der Testsubstanz entsprach bei einigen Zelltests dem jeweiligen IC₅₀-Wert (siehe 3.6.7, 3.7.2 und 3.8.2). Dieser war mit Hilfe des MTT-Tests von meinen Kolleginnen Dipl.-Biochem. Antje Grotemeier, Dr. Miroslava Žoldáková und Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht ermittelt worden.^[115] Die genauen Daten sind den entsprechenden Literaturstellen zu entnehmen.

2.2 Optimierung der Produktion von Illudinen

2.2.1 Nachweis von Illudinen per HPLC

Es wurde eine HPLC-Methode zur Trennung und Bestimmung von Illudin M **11** und Illudin S **11a** entwickelt. Als Säule wurde eine Ultrasep ES 100 RP18 6 μm (Bischoff Chromatography, Leonberg) verwendet, als Laufmittel ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 73:27 (isokratisch). Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion fand bei einer Wellenlänge von 254 nm statt. Die Proben wurden in Wasser gelöst (1 mg/ml) und direkt vor dem Einspritzen 1:1 mit Methanol gemischt. Davon wurden 10 μl aufgebracht. Als Referenz wurden isolierte Proben von **11** und **11a** verwendet (siehe Abb. 2.17).^[116]

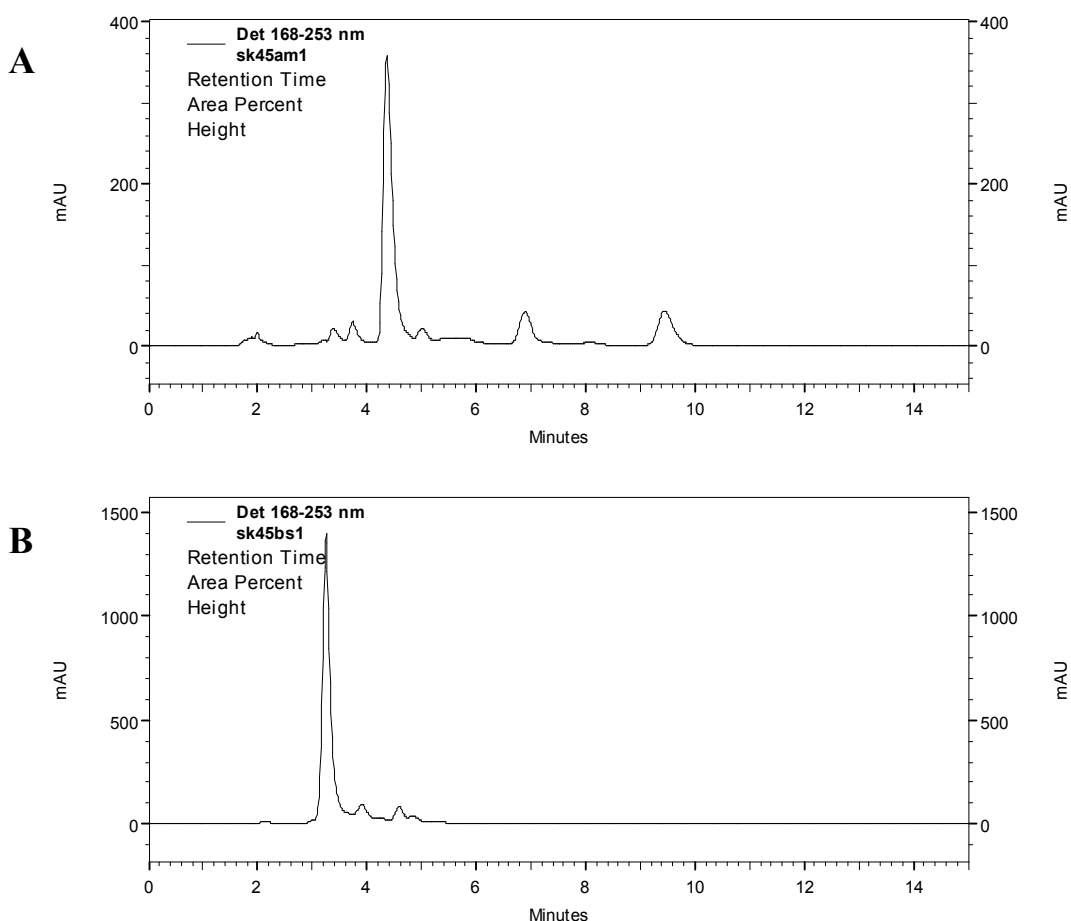


Abbildung 2.17: Chromatogramme von 11 und 11a

10 μl einer wässrigen Lösung (1 mg/ml) von aufgereinigtem **11** (Teilbild A) bzw. **11a** (Teilbild B) wurden 1:1 mit Methanol gemischt und per HPLC untersucht. Die Retentionszeit für **11** liegt bei 4,2 min, die von **11a** bei 2,6 min.

Um Anhand der bei der HPLC-Analyse gemessenen Absorption festzustellen, wie viel von der jeweiligen Verbindung im Rohextrakt enthalten ist, wurden Eichgeraden erstellt. Dazu wurden verschieden stark konzentrierte Verdünnungen mit der beschriebenen Methode untersucht (siehe Abb. 2.18).

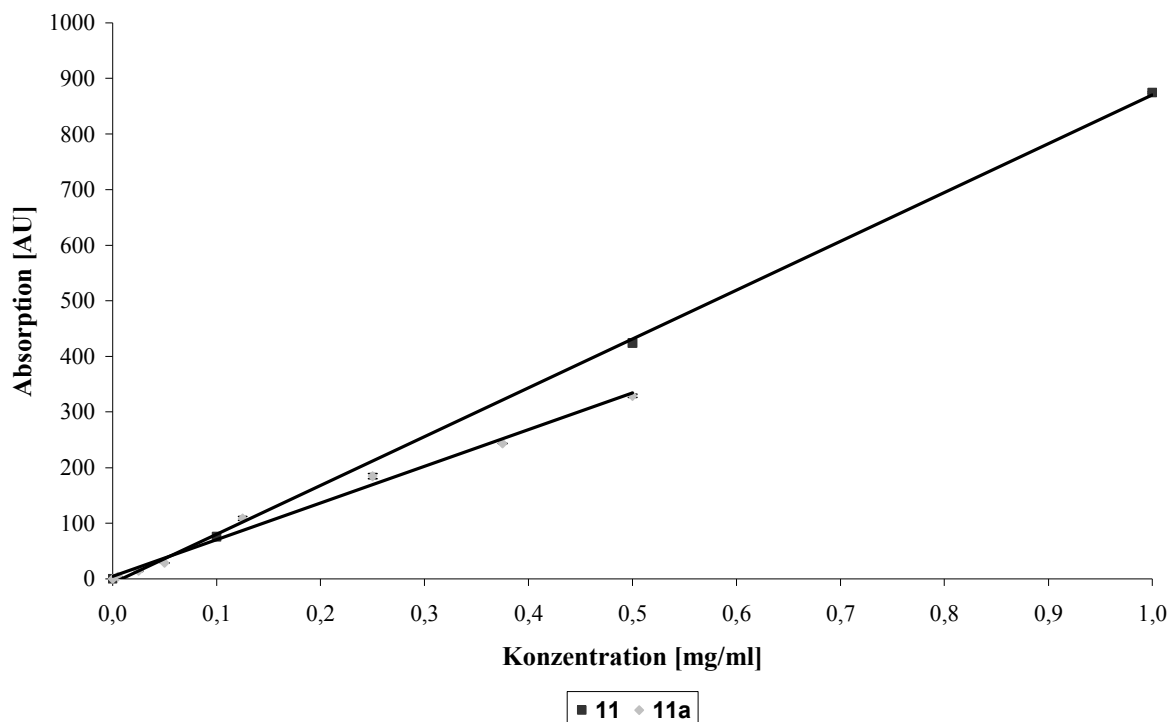


Abbildung 2.18: Eichgeraden zur Bestimmung der Konzentration von Illudin M und S

Die Abbildung zeigt Eichgeraden mit denen man per HPLC-Analyse die Konzentration von Illudin M bzw. S. anhand der Absorption bestimmen kann. Die Geradengleichung zur Berechnung von **11** lautet $Abs = 878,1c - 7,8$ ($R^2 = 0,9997$), die zur Berechnung von **11a** lautet $Abs = 660,4c + 4,2$ ($R^2 = 0,9912$). *Abs* steht hierbei für die Absorption und *c* für die Konzentration in der wässrigen Lösung.

Bei der Untersuchung von Rohextrakt wurde die gleiche Methode angewandt, die Konzentration betrug jedoch 10 mg/ml. Wässriges Medium wurde zuerst mit der Hilfe von Zentrifugenfiltern gereinigt, dann im Verhältnis 1:1 mit Methanol gemischt und auf die Säule aufgebracht.^[116] Um vergleichen zu können, welche Methode sich für die Gewinnung von Illudin M **11** bzw. Illudin S **11a** am besten eignet, wurde mit Hilfe der oben aufgeführten Geradengleichungen die Konzentration der jeweiligen Verbindung im Rohextrakt bestimmt. Daraus wurde dann unter Einbeziehung der Masse des Rohextrakts die jeweilige Substanzmenge berechnet. Diese wurde auf die analysierte Menge an Kulturmedium bezogen,

so dass *de facto* immer die Menge an zur Verfügung stehendem **11** bzw. **11a** pro Liter Kulturmedium verglichen wurde. Bei gleich bleibender Extraktionsmethode ist dieser Wert ein Maß für die Produktivität unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen. Im Gegenzug ist er bei gleicher Aufzucht und veränderten Extraktionsmethoden ein Maß für deren Effektivität.

2.2.2 Bestimmung der optimalen Aufzuchtbedingungen für die Illudinproduktion

Um festzustellen unter welchen Bedingungen sie die größte Menge an **11** bzw. **11a** liefern, wurden die Pilze *Omphalotus olearius* DSM 3398 und *Pleurotus japonicus* ATCC 20195 in verschiedenen Medien aufgezogen.^[70, 117, 118] Die Kultivierung erfolgte anfangs auf Sabouraud-2%-Glucose-Agar, zu Analysezwecken in Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml Fassungsvermögen und 200 ml Inhalt unter Schütteln bei Raumtemperatur. Zum Animpfen wurde ein Stück Myzel in den jeweiligen Kolben überführt. Dies erfolgte parallel, wobei darauf geachtet wurde, dass die Ausgangsmenge nach Möglichkeit immer gleich groß war. Eine Untersuchung hinsichtlich des Einflusses der Wachstumszeit fand aufgrund des ungleichmäßigen Wachstums in den einzelnen Kolben nicht statt. Folgende Medien wurden getestet:

SGSMØ-Medium (Sojapepton-Glucose-Stärke-Medium ohne CaCO₃)^[116]

40 g	Glucose-Monohydrat
10 g	Sojapepton
10 g	Stärke (löslich)
1 ml	Tween 80
ad 1000 ml	VE-Wasser
pH	6,5

CDM-Medium (Czapek-Dox-Mineral Solution-Modified)^[119]

40 g	Glucose-Monohydrat
5 g	Corn-steep solids
3 g	NaNO ₃
1 g	KH ₂ PO ₄
0,5 g	KCl
0,5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,014 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,6

GCSL-Medium (Glucose-Corn-steep liquor)^[70]

40 g	Glucose-Monohydrat
5 g	Corn-steep liquor
1 g	KH ₂ PO ₄
0,5 g	KCl
0,5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
5 g	Trockenhefe
10 g	Na-Glutamat Monohydrat
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,6

HA-Medium^[120]

4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,5

HA-Medium (modifiziert)^[120]

4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
5 g	L-Valin
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,5

MSP-Medium (Malzextrakt-Sojapepton)^[121]

30 g	Malzextrakt
3 g	Sojapepton
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,6

Die Pilzkultur wurde nach einer Wachstumsphase von 4 Wochen abgeerntet. Dabei wurde das Medium zuerst grob abfiltriert um das Pilzmyzel zu entfernen und je nach Bedarf für 15 min bei 2000 rpm (925·g) abzentrifugiert. Das Medium wurde dann unter Anlegen von Unterdruck abgesaugt. Das Myzel wurde mit Wasser gewaschen und das Waschwasser mit dem Medium vereinigt. Das so gereinigte Medium wurde sechs mal mit jeweils 500 ml Essigsäureethylester im Scheidetrichter extrahiert. Nach der Trocknung über Natriumsulfat, wurde das Lösungsmittel entfernt. Der so erhaltene Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C unter Argon gelagert. Er wurde per Massenspektrometrie qualitativ auf das Vorhandensein von **11** oder **11a** überprüft. Ein Beispiel für das Ergebnis der MS-Analyse ist in Abb. 2.19 zu sehen.

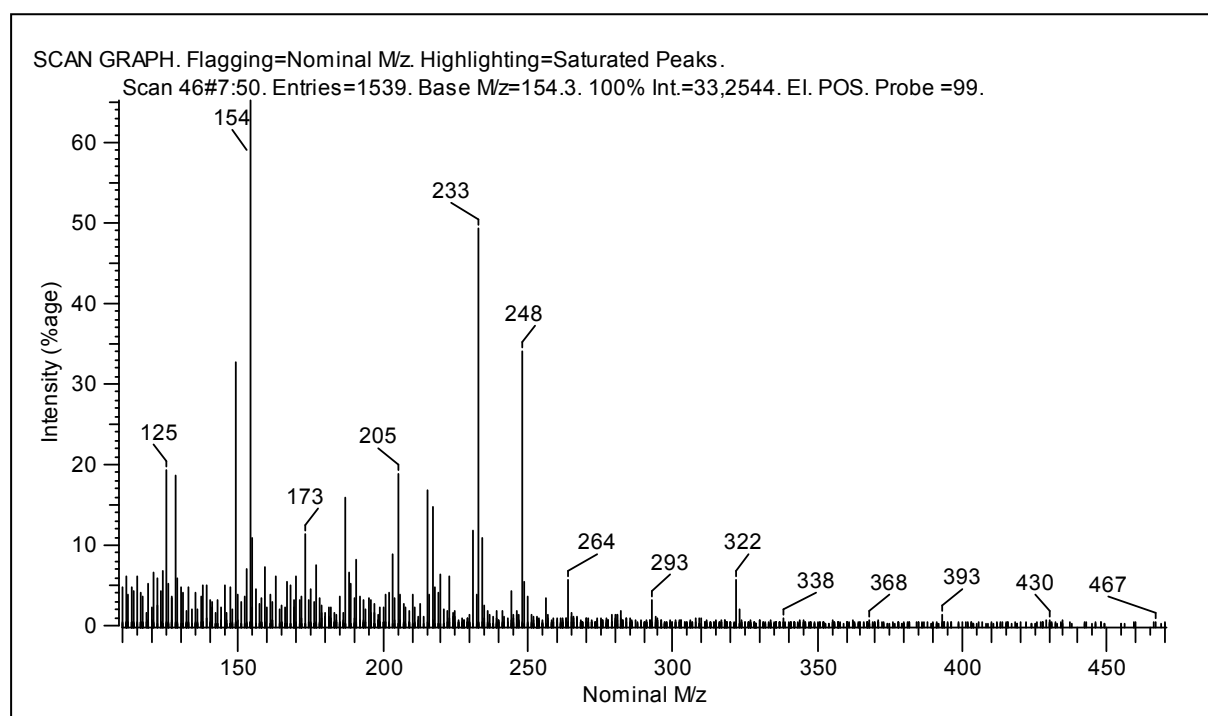


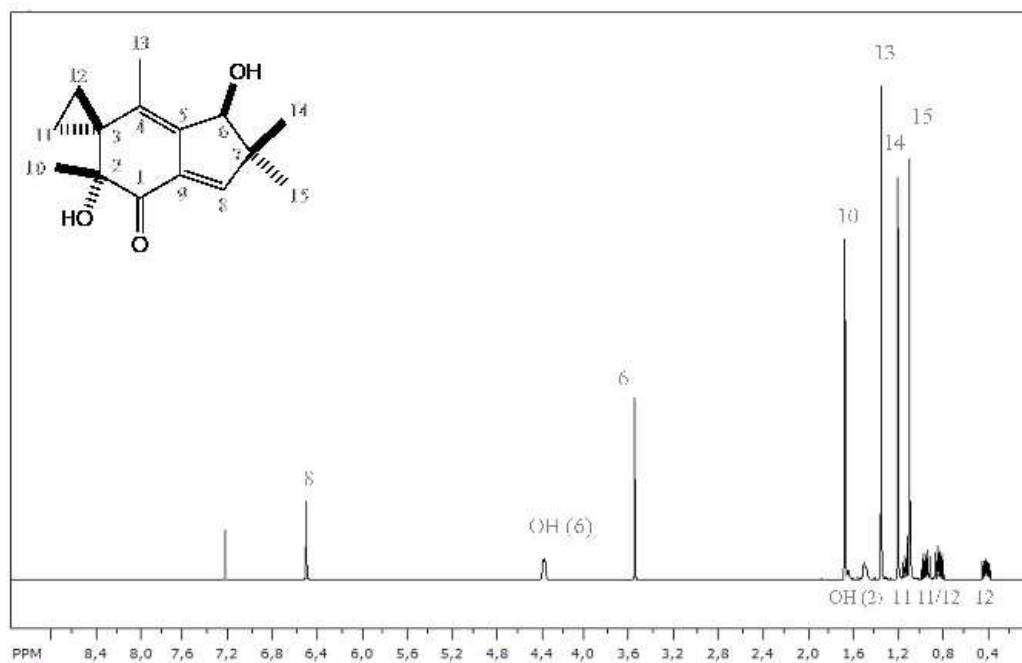
Abbildung 2.19: Massenspektrum des Rohextraktes

Zu sehen ist das Massenspektrum eines Essigsäureethylesterextrakts des Kulturmediums von *O. olearius* (SGSMØ-Medium). Die M^+ -Peaks von Illudin M **11** (248) und Illudin S **11a** (264) sind deutlich zu erkennen.

Beim Vergleich der einzelnen Medien wurde der Gehalt an **11** und **11a** quantitativ wie unter 2.2.1 beschrieben ermittelt. Zusätzlich zur Analyse per HPLC erfolgte auch eine säulenchromatographische Aufreinigung über Silicagel (Säulenlänge: 30 cm, Durchmesser: 3 cm). Als Laufmittel wurden hierbei verschiedene Gemische von n-Hexan, Essigsäureethylester und Aceton getestet. Die Bestimmung der Fraktionen, die **11** bzw. **11a** enthielten, erfolgte mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie. Als Laufmittel hierfür wurde ein Gemisch aus n-Hexan und Essigsäureethylester in Verhältnis 2:1 verwendet. Der Retentionsfaktor von **11** betrug 0,35, der von **11a** konnte nicht eindeutig ermittelt werden, da bei den Chromatogrammen mehrere Banden zu erkennen waren. Die endgültige Identifizierung wurde mittels Massenspektrometrie und NMR (^1H und ^{13}C) vorgenommen. Die Bestimmung des Reinheitsgrades erfolgte per HPLC und anhand der NMR-Daten. Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurde CDCl_3 verwendet und als Referenz dienten die entsprechenden Literaturwerte.^[69] In Abb. 2.20 sind ein ^1H - und ein ^{13}C -NMR von aufgereinigtem **11** zu sehen, in Abb. 2.21 ein ^1H -NMR von isoliertem **11a**. Da trotz der Aufreinigung immer noch Verunreinigungen enthalten waren, wurde von **11a** kein ^{13}C -NMR

angefertigt. Zur Verdeutlichung sind die Strukturen der jeweiligen Verbindung mit der Zuordnung der einzelnen Atome zu den jeweiligen Peaks angegeben.

A



B

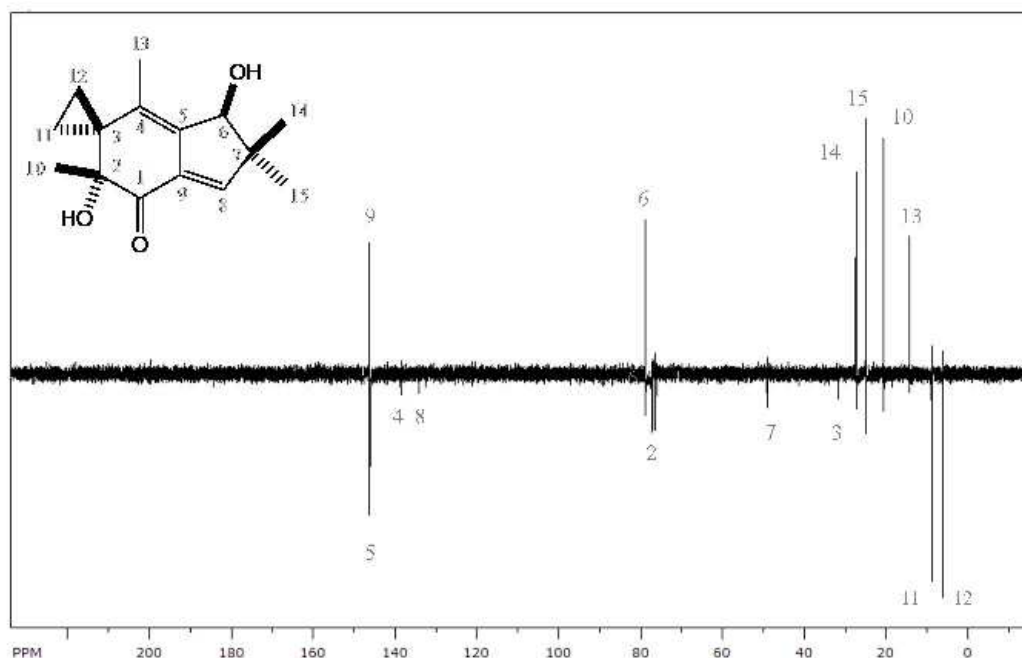


Abbildung 2.20: ^1H - und ^{13}C -NMR von isoliertem **11**

Teilbild A zeigt ein ^1H -NMR, Teilbild B ein j-moduliertes ^{13}C -NMR von aufgereinigtem **11**. Den Peaks der Messungen sind die Nummern der entsprechenden Wasserstoff- bzw. Kohlenstoffatome zugeordnet. Die Peaks in der Abbildung entsprechen den Literaturwerten.

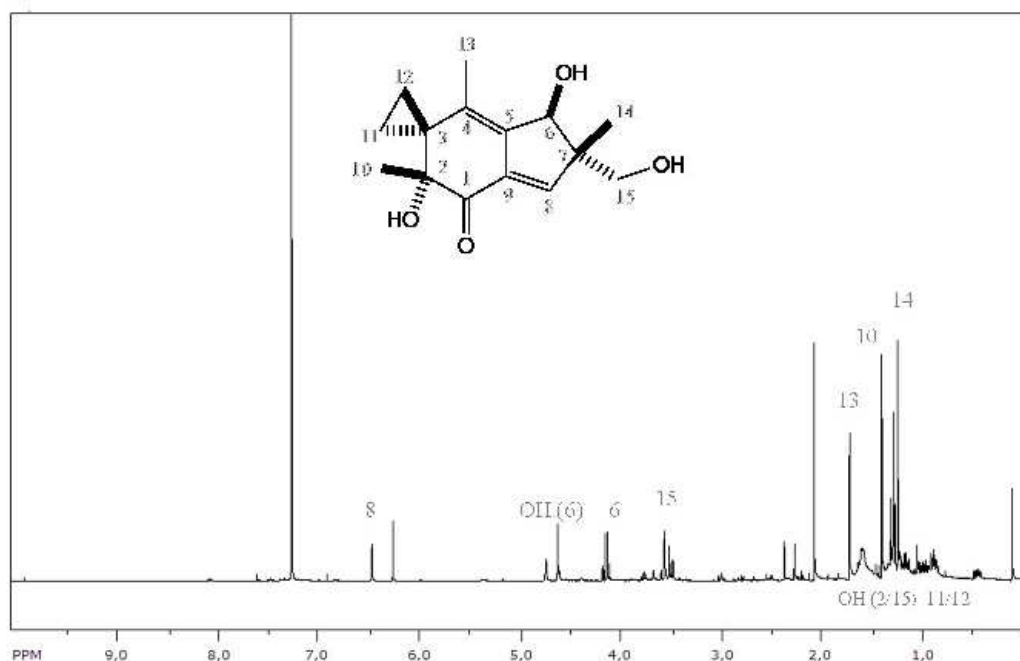


Abbildung 2.21: ¹H-NMR von isolierten **11a**

Das NMR zeigt die für **11a** charakteristischen Peaks, die auch in der Literatur angegeben sind. Ihnen sind die Nummern der entsprechenden Wasserstoffe zugeordnet. Es handelt sich also um **11a**, allerdings sind noch starke Verunreinigungen enthalten.

2.2.3 Entwicklung der optimalen Extraktionsmethode

Nach Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen, wurden verschiedene Methoden zur Extraktion von **11** aus dem Medium getestet. Da das Hauptaugenmerk bei der Gewinnung von **11** lag und **11a** zudem kaum zu isolieren war, wurde diese Verbindung hierbei vernachlässigt. Beim Vergleich der einzelnen Verfahren wurde der Illudingehalt im Rohextrakt wie unter 2.2.1 beschrieben quantitativ ermittelt. Die Gewinnung des Mediums erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Medienart und Pilzstamm blieben hierbei konstant (HA- bzw. *Omphalotus olearius*).

2.2.3.1 Extraktion mit Essigsäureethylester und Chloroform

Das gereinigte Medium wurde mit Essigsäureethylester im Scheidetrichter extrahiert, wobei das Lösungsmittel sechsmal gewechselt wurde. Anschließend wurde der Gehalt an **11** und **11a** im Rohextrakt mittels HPLC bestimmt. Diese Methode diente als Referenz für die anderen beschriebenen Methoden. Die Extraktion mit Chloroform erfolgte analog zu der mit Essigsäureethylester.

2.2.3.2 Extraktion nach Kutscher-Steudel

Alternativ erfolgte die Extraktion des Mediums auch mit Hilfe eines Extraktors nach Kutscher-Steudel (siehe Abb. 2.22). Dieser wurde mit 1,25 l Medium und so viel Lösungsmittel befüllt, dass der Überlauf erreicht wurde und der Dreihalskolben bis zur Hälfte gefüllt war (ca. 1 l). Durch Erhitzen des Kolbens und Kondensation am Rückflusskühler gelangt das Lösungsmittel über den Trichter von unten in das Medium. Auf dem Weg durch das Medium werden vom Lösungsmittel die Inhaltsstoffe mitgenommen, die sich dadurch im Vorratsgefäß anreichern. Als Lösungsmittel wurden Essigsäureethylester und Diethylether getestet. Die Extraktionsdauer betrug 5,5 h beginnend mit der ersten Kondensation am Rückflusskühler. Nach der Extraktion wurde das Medium verworfen oder je nach Bedarf für weitere Untersuchungen aufgehoben. Die organische Phase wurde gesammelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rohextrakt wurde per HPLC untersucht (siehe 2.2.1). Um festzustellen, ob sich nach der ersten Extraktion noch **11** im Medium befindet, wurde dieses nochmals auf die gleiche Weise extrahiert und analysiert.^[122]

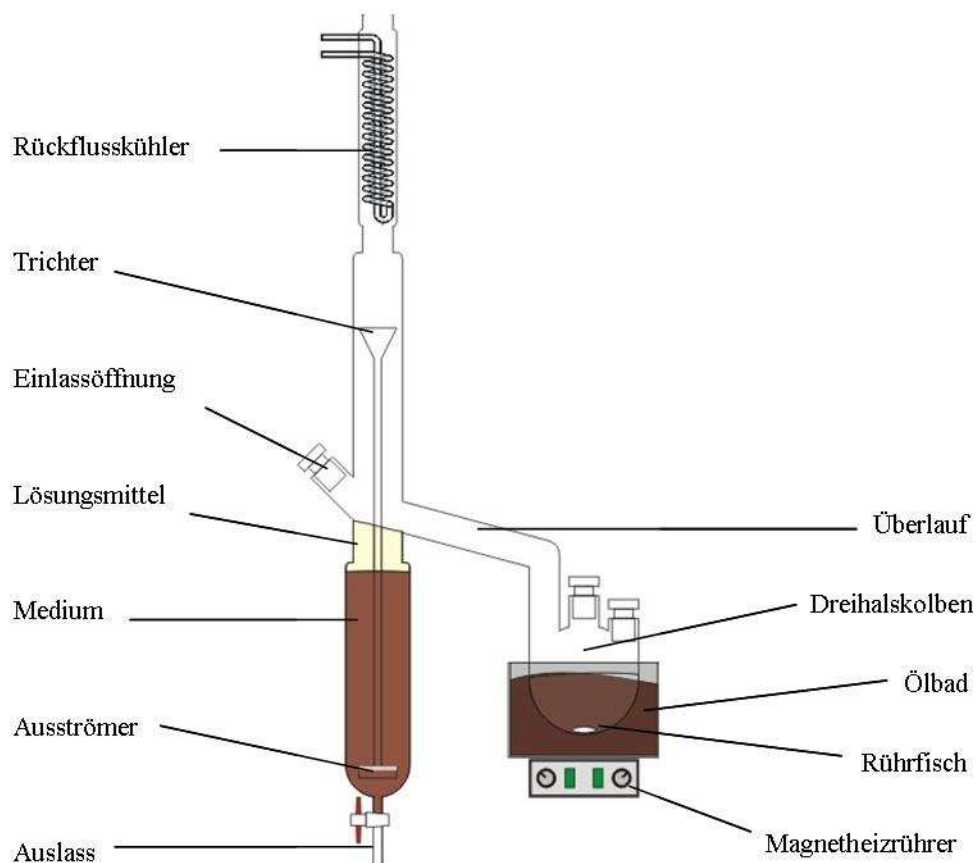


Abbildung 2.22: Analytische Extraktion nach Kutscher-Steudel

Zu sehen ist eine schematische Darstellung der Apparatur, mit deren Hilfe versucht wurde, **11** aus dem Medium zu extrahieren. In der hier gezeigten Variante ist nur ein Extraktor am Dreihalskolben angebracht, so wie es zu Testzwecken üblich war. Nach dem Erhitzen steigen die Lösungsmitteldämpfe bis zum Rückflusskühler, wo sie wieder kondensierten. Von dort gelangt das Lösungsmittel über Trichter und Ausströmer von unten in das Medium. Es steigt durch das Medium nach oben und fließt über den Überlauf zurück in den Dreihalskolben.^[122]

2.2.3.3 Gewinnung von Illudin M unter Verwendung von Amberlite® XAD16

Alternativ zu den beschriebenen Extraktionsmethoden wurde auch untersucht, ob es möglich wäre, **11** durch Adsorption direkt aus dem Medium zu gewinnen. Hierbei fand die Substanz XAD16 Verwendung.^[123] XAD16 ist ein nichtionisches makroretikulares Harz, das durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen dazu in der Lage ist, ionische Stoffe zu absorbieren und auch wieder abzugeben (siehe Abb. 2.23).

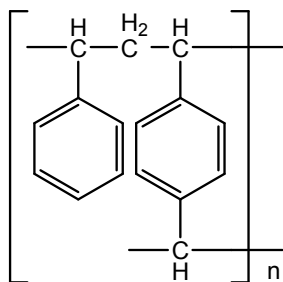


Abbildung 2.23: Strukturformel von XAD16

Zu sehen ist ein exemplarischer Ausschnitt aus der Strukturformel des Polymers XAD16. Die Partikelgröße beträgt 20-60 mesh mit einer durchschnittlichen Porengröße von 100 Å, einem Porenvolumen von 1,82 ml/g und einer Oberfläche von 800 m²/g.

Zur Vorbereitung wurde die benötigte Menge an XAD16 in eine Chromatographiesäule gegeben und mit VE-Wasser solange gespült, bis das ausfließende Wasser einen pH-Wert entsprechend dem des Mediums erreicht hatte (pH 5,5). Dann wurde das Harz in wässriger Suspension autoklaviert. Die Aufzucht des Pilzes zu Analysezwecken fand in einem mit HA-Medium befüllten Erlenmeyerkolben mit 1 l Fassungsvermögen statt. Dabei wurde die Zusammensetzung der Bestandteile des Mediums so variiert, dass nach der Zugabe der wässrigen Suspension von XAD16 wieder die ursprünglichen Konzentrationen vorlagen. Das Harz nahm dabei 2-3% des Gesamtvolumens von 800 ml ein. Als Referenz wurde ein Kolben mit gleichem Inhalt ohne XAD16 verwendet. Zum Animpfen wurde ein Stück Myzel von einer Agarplatte in den jeweiligen Kolben überführt. Es wurden verschiedene Versuchsansätze gestartet, bei denen die Zugabe des Harzes entweder mit oder einige Zeit nach dem Animpfen erfolgte. Nach einer Wachstumsphase von 4 Wochen wurden beide Ansätze parallel geerntet. Das XAD16 wurde abfiltriert und von den größten Pilzresten befreit. Dann wurde es in eine Chromatographiesäule gegeben und um die absorbierten Inhaltsstoffe herauszulösen so lange gespült bis die organische Phase farblos wurde. Als Lösungsmittel wurden hierbei Essigsäureethylester und Aceton verwendet. Der Extrakt wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das zugehörige Kulturmedium sowie der Kontrollansatz wurden wie in 2.2.3.2 beschrieben mit Diethylether extrahiert. Die Analyse der gewonnen Rohextrakte erfolgte mittels HPLC (siehe 2.2.1).

2.3 Gewinnung von Illudin M im Grammmaßstab

2.3.1 Aufzucht

Nach der Ermittlung der idealen Aufzuchtbedingungen wurden diese wie folgt auf einen größeren Maßstab übertragen: Die Gewinnung von Illudin M **11** erfolgte unter Verwendung des Pilzes *Omphalotus olearius* DSM 3398 und des Mediums HA-.^[117, 120] Zum Ansetzen der Vorkultur wurde ein Stück Myzel von einer Agarplatte in einen mit 200 ml Medium gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben. Nach einer Wachstumsphase von 3 Wochen unter Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Inhalt von drei Kolben zum Beimpfen eines Großansatzes herangezogen. Hierzu wurde ein selbstgebauter Fermenter mit 20 l Fassungsvermögen verwendet, in dem sich 18 l HA-Medium befanden (siehe Abb. 2.24). Als Basis diente eine Ballonflasche aus Polycarbonat. Diese wurde zuerst mit Medium befüllt, autoklaviert und nach dem Abkühlen wurde die Vorkultur hinzugefügt. Die Zufuhr von Frischluft erfolgte über Sterilfilter mit Hilfe einer Aquariumpumpe, was gleichzeitig auch für eine Durchmischung des Mediums sorgte. Um eine Kontamination der Umgebung mit Pilzsporen zu vermeiden, wurde die Abluft des Fermenters über Watte filtriert und über einen Abzug abgeleitet. Zur Entnahme von Medium wurde der Abluftschlauch mit einer Klemme verschlossen, so dass sich ein Überdruck bilden konnte. Anschließend wurden Klemme und Hahn am Probennahmeschlauch geöffnet, wodurch das Medium in ein Auffanggefäß abfließen konnte. Nach Beendigung der Entnahme wurde der Hahn geschlossen und die Klemme am Abluftschlauch geöffnet um so wieder für einen Druckausgleich zu sorgen. Um noch im Schlauch befindliches Medium zurück in die Flasche zu bringen, wurde die Klemme am Druckausgleichschlauch geöffnet.

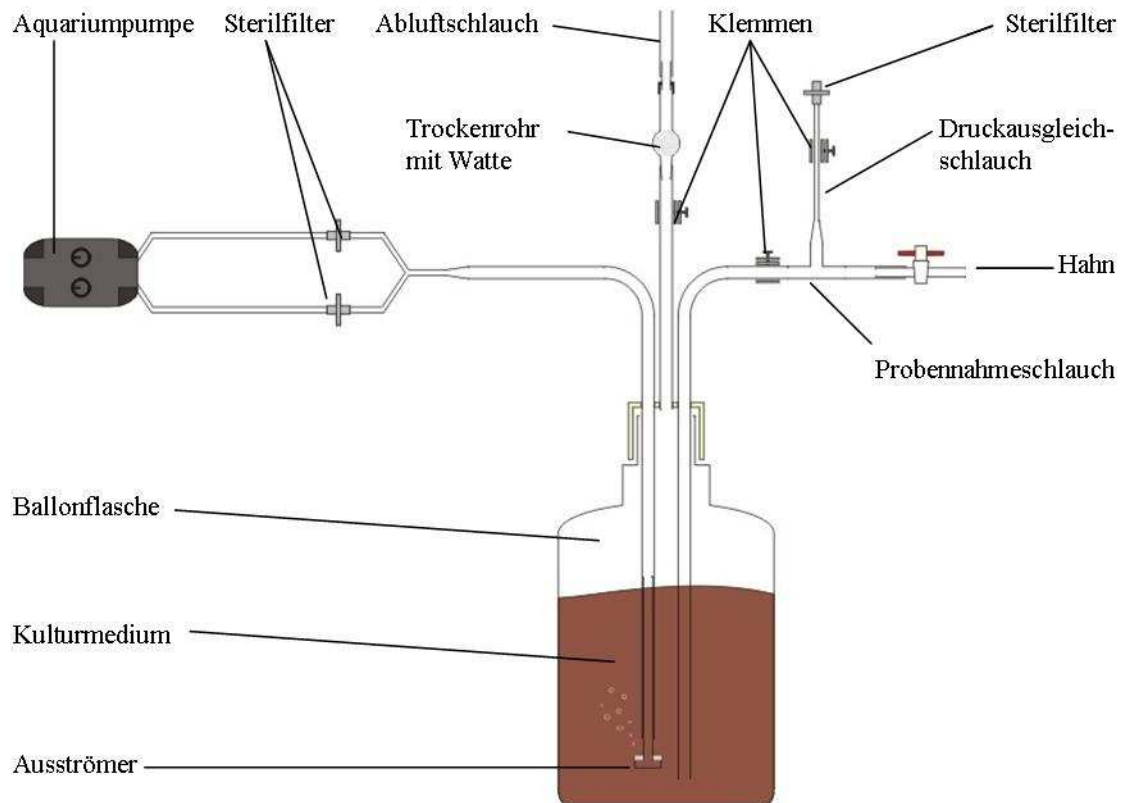


Abbildung 2.24: Aufbau des selbstgebauten Fermenters zur Gewinnung von 11

Das Wachstum des Pilzes erfolgte in 18 l Medium, die sich in einer Ballonflasche befanden. Luft aus der Umgebung wurde mit Hilfe einer Aquariumpumpe über zwei Sterilfilter und einen Ausströmer in das Medium eingeleitet. Dadurch wurde eine Durchmischung des Mediums und Sauerstoffversorgung des Pilzes sichergestellt. Die Abluft konnte über ein mit Watte gefülltes Trockenrohr entweichen. Klemmt man den Abluftschlauch ab, bildet sich ein Überdruck, der das Medium in den Probennahmeschlauch presst. So ist eine sterile Entnahme des Mediums möglich.

HA-Medium:

4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
ad 1000 ml VE-Wasser	
pH	5,5

2.3.2 Gewinnung des Rohextrakts

Das Kulturmedium wurde nach einer Wachstumsphase von 4 Wochen abgeerntet und gereinigt. Dazu wurde es nach Bedarf zuerst mit einem Sieb von größeren Pilzstücken befreit und anschließend unter Vakuum abfiltriert. Danach erfolgte die Extraktion nach Kutscher-Steudel wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Als Lösungsmittel wurde Diethylether verwendet. Um eine größere Menge extrahieren zu können, wurden zwei Extraktoren mit einem Fassungsvermögen von jeweils 1,5 l an einen 1 l-Dreihalskolben angebracht (siehe Abb. 2.25). Die Extraktionsdauer betrug 5,5 h. Danach wurde das Medium verworfen, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingedunstet. Zurück blieb nur noch der Rohextrakt.

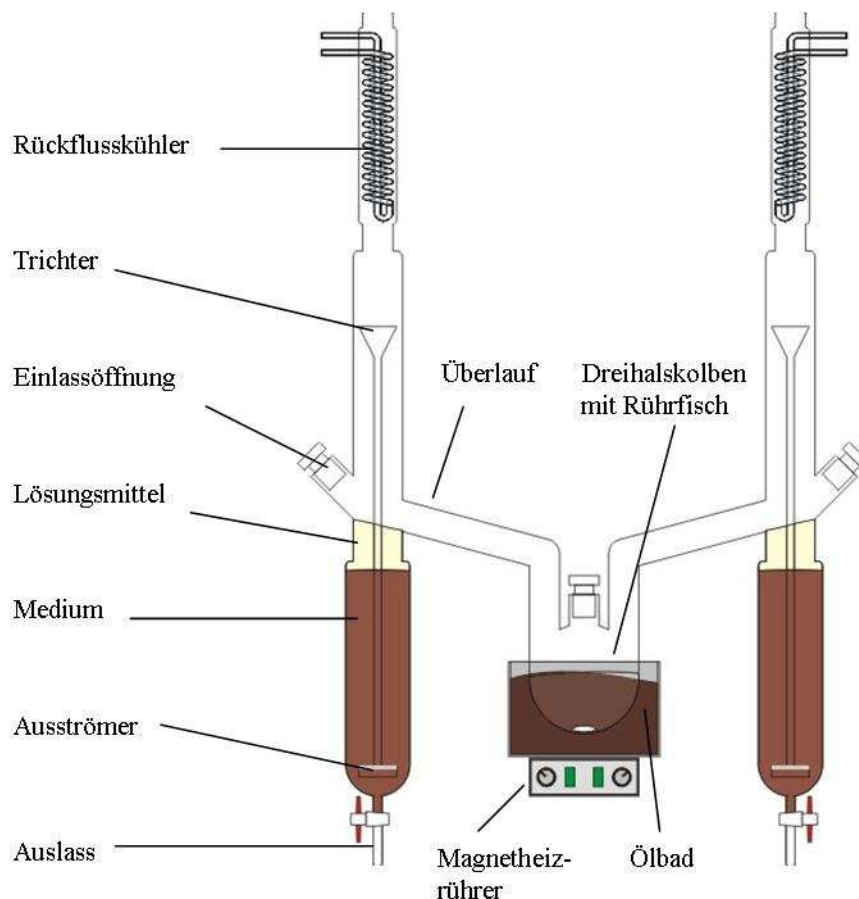


Abbildung 2.25: Extraktion nach Kutscher-Steudel

In der Abbildung ist eine schematische Darstellung der Extraktionsapparatur zu sehen (vgl. Abb. 2.22). In der hier gezeigten Variante sind zur Gewinnung größerer Mengen zwei Extraktoren am Dreihalskolben angebracht.^[122]

Um zu vermeiden, dass sich in dem filtrierten Medium erneut ein störendes Pilzmyzel ausbildet, wurde darauf geachtet, dass zwischen der Entnahme aus dem Fermenter und der Extraktion maximal 24 h lagen. Der Rohextrakt wurde bei -20° C unter Argon gelagert um eine Oxidation von **11** zu verhindern.

2.3.3 Aufreinigung von Illudin M

Die Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel, als Laufmittel wurde ein Gemisch aus n-Hexan und Essigsäureethylester im Verhältnis 2:1 verwendet (Säulenlänge: 30 cm, Durchmesser: 3 cm). Aufgetragen wurde der Rohextrakt, der bei der Extraktion von 18 l Medium gewonnen wurde. Fraktionen, die **11** enthielten, wurden gepoolt und eingeeengt. Ihre Bestimmung erfolgte mit Hilfe von Dünnschicht-Chromatographie, die endgültige Identifizierung per ¹H-NMR. Die Bestimmung der Reinheit wurde ebenfalls anhand der NMR-Daten vorgenommen (vgl. Abb. 2.20). Das Lösungsmittel hierbei war CDCl₃, als Referenz dienten die entsprechenden Literaturwerte.^[69] Da das nach der säulenchromatographischen Aufreinigung gewonnene **11** immer noch einen gewissen Anteil an Verunreinigungen aufwies, folgte eine Umkristallisation. Dazu wurde das rohe **11** in Ether gelöst und mit Pentan oder alternativ Hexan bei Kälte wieder ausgefällt. Dieser Schritt war erst kurz vor der weiteren Verwendung von meinem Kollegen Dipl.-Chem. Sebastian Seibt vorgenommen worden.

2.3.4 Aufreinigung von Illudin S

Nach der Isolation von **11**, erfolgte ein Wechsel des Laufmittelgemisches über n-Hexan und Essigsäureethylester im Verhältnis 1:1 und 2:1 hin zu reinem Essigsäureethylester. Die Fraktionen, die Spuren von **11a** enthielten, wurden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Auch die Bestimmung dieser Fraktionen erfolgte mit ¹H-NMR-Spektroskopie. Aufgrund der Verunreinigungen war bei der Dünnschicht-Chromatographie eine eindeutige Bestimmung der Banden von **11a** nicht möglich. Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie diente auch hier CDCl₃, die Literaturwerte wurden erneut als Referenz herangezogen.^[69, 116]

2.4 Stabilitätsuntersuchungen an Estern

2.4.1 Tests an (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexen per HPLC

Die Bildung einer Esterbindung ist eine Gleichgewichtsreaktion, bei der Wasser frei wird. Aus diesem Grund ist es möglich, dass Ester im wässrigen Milieu hydrolysiert werden (siehe Abb. 2.26). Die dabei entstehenden Abbauprodukte können wiederum andere bioaktive Eigenschaften aufweisen. Um festzustellen, ob es bei den untersuchten Platinkomplexkonjugaten zu einer derartigen Spaltung kommt, wurde eine HPLC-Analysemethode entwickelt. Mit dieser wurden die Derivate **13a**, **16c** und **18** exemplarisch untersucht.

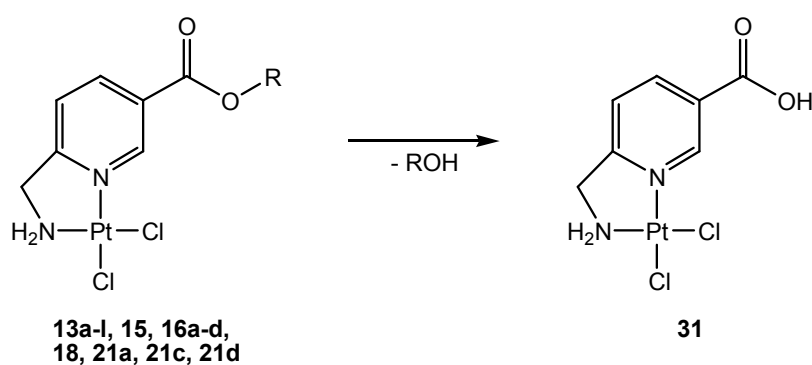


Abbildung 2.26: Hydrolyse der Esterbindung von Platinkomplexkonjugaten

Zu sehen ist die allgemeine Strukturformel eines (6-Aminomethylnicotinat)platin-(II)-Komplexkonjugats, wobei R für einen beliebigen Rest steht. Die Formel gilt für die Platinderivate **13a** bis **13l**, **15**, die platinhaltigen Steroidkonjugate **16a** bis **16d** und **18**, sowie die Chalkon-Platinkomplexkonjugate **21a**, **21c** und **21d** (vgl. Abb. 2.1 bis 2.6 und 2.9). Bei der Hydrolyse entsteht die platiniierte 6-Aminomethylnicotinsäure **31** sowie der entsprechende Alkohol.

Für die Untersuchung wurde die Testsubstanz in einer Konzentration von 20 mM in DMF gelöst und 1:10 mit PBS (pH 7,4) verdünnt. Es folgte eine Inkubation bei 37° C, zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Vor der Entnahme wurde der Ansatz gründlich durchmischt um eventuell ausgefallene Substanz wieder in Lösung zu bekommen. Der Probe wurde die gleiche Menge an Methanol zugegeben, davon wurden dann 50 µl analysiert. Als Säule wurde eine Ultrasep ES 100 RP18 6 µm (Bischoff Chromatography, Leonberg) verwendet, als Laufmittel ein isokratisches Gemisch aus Methanol und Wasser mit einer Flussrate von 1 ml/min. Das Laufmittelverhältnis und die Wellenlänge bei der detektiert

wurde, hingen von der jeweiligen Verbindung ab. Bei **13a** und **16c** wurde ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 70:30 verwendet. Die Detektion von **13a** erfolgte bei einer Wellenlänge von 226 nm. Da **16c** nicht detektiert werden konnte, wurde als Referenz das besser nachweisbare Estradiol **5b** verwendet, das bei einer eventuellen Hydrolyse entstehen würde. Dessen Detektion fand bei 208 nm statt. Bei **18** betrug das Verhältnis von Methanol zu Wasser 87,5:12,5, detektiert wurde **18** bei 208 nm. Es wurden nach der beschriebenen Methode Eichgeraden zur Bestimmung der Konzentration anhand der Absorption erstellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Ergebnis als prozentualer Anteil im Verhältnis zum jeweiligen Anfangswert angegeben.

2.4.2 Tests an Rutheniumkomplexkonjugaten via Absorptionsmessung

Neben der Analyse per HPLC wurde noch eine weitere Methode angewandt, um die Stabilität der Esterbindung ausgewählter Derivate zu untersuchen. Hierbei machte man sich zu Nutze, dass die Steroid-Rutheniumkomplexkonjugate **19a** und **19b** im Bereich von 350 bis 600 nm eine höhere Absorption aufweisen als die bei der Hydrolyse entstehenden Produkte (siehe Abb. 2.27 und 2.28). Es wurde 1 ml einer 0,2 mM Lösung der Testverbindung in PBS mit 2% DMSO bei 37° C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 500 µl entnommen und es wurde ein UV/vis-Spektrum davon erstellt. Danach wurde die Probe wieder zurückgegeben.

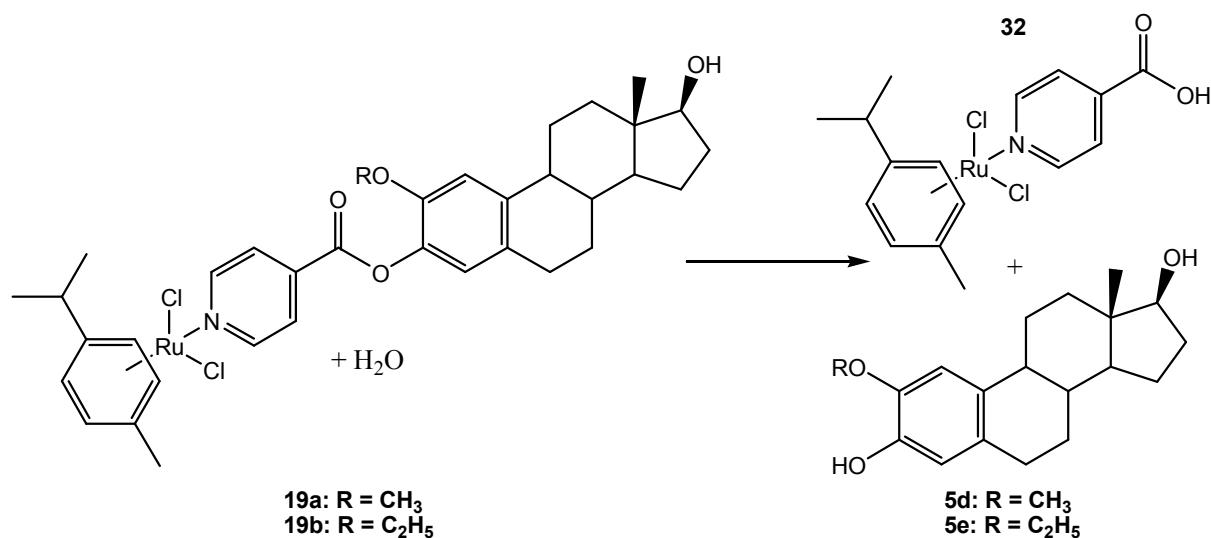


Abbildung 2.27: Hydrolyse der Esterbindung von Rutheniumkomplexkonjugaten

Bei der Hydrolyse der Rutheniumkomplexkonjugate **19a** entsteht **32** sowie das entsprechende Steroid **5d**. Bei der von **19b** werden **32** und **5e** gebildet.

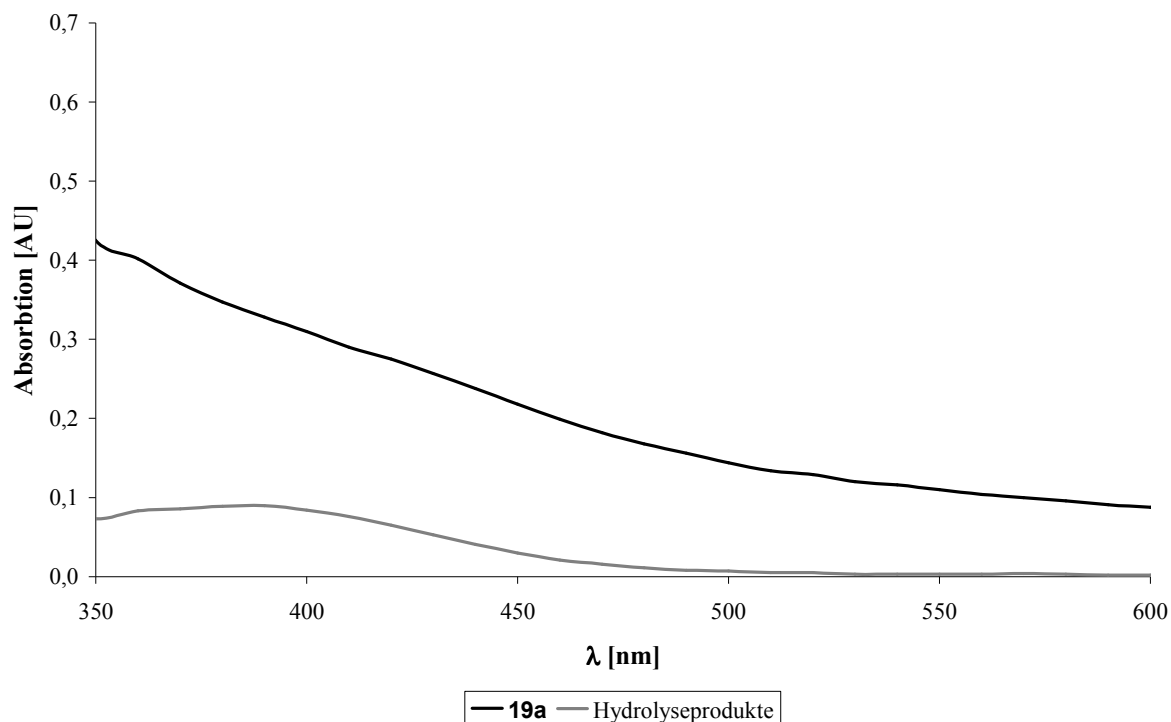


Abbildung 2.28: Absorptionsspektren **19a und den möglichen Hydrolyseprodukten**

Zu sehen ist die Absorption einer 0,2 mM Lösung von **19a** (in PBS (pH 7,4) mit ≤ 2 DMSO) bei der jeweiligen Wellenlänge (350 bis 600 nm). Daneben ist auch das Absorptionsspektrum einer Mischung von **32** und **5d** im gleichen Lösungsmittel abgebildet. Dies sind die beiden Produkte, die bei einer Hydrolyse entstehen würden (vgl. Abb. 2.27). Ihre Konzentration betrug ebenfalls jeweils 0,2 mM.

2.5 Untersuchung der Bildung von Metallkomplexen

Viele cytotoxische Verbindungen sind Metallkomplexe (vgl. 1.2.2). Da deren physiologische Wirkung von den Liganden abhängt, wurde eine Methode gesucht, um die Stabilität eines derartigen Komplexes zu evaluieren. Da Metallkomplexe meist eine intensive Färbung aufweisen, die sich deutlich von der der eingesetzten Liganden unterscheidet, erfolgte eine spektrometrische Analyse. Als Maß für die Stabilität dienten hierbei die Bindungskonstante K_D bzw. der pM-Wert.

2.5.1 Durchführung

In einer Plastikkuvette wurden 870 µl einer Mischung aus 0,1 M Natriumacetat und Methanol (1:4) vorgelegt. Die Lösung wurde mit 100 µl einer 10 mM Stammlösung der Testsubstanz in Methanol versetzt, dann wurden 30 µl einer 10 mM Lösung des jeweiligen Metallsalzes in Methanol zugefügt. Die Substanzkonzentration im fertigen Ansatz lag somit bei 1 mM, die der Kationen bei 0,3 mM. Es folgte eine je nach Metallsalz unterschiedliche Inkubation (siehe Tab. 2.1), dann wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich von 200 bis 800 nm aufgenommen. Parallel dazu wurde auf die gleiche Weise ein vergleichbarer Ansatz unter Verwendung einer Natriumacetat/Methanol-Mischung mit 0,2 mM EDTA untersucht. Dieser Versuch wurde sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 5,5 durchgeführt.

Tabelle 2.1: Reaktionsbedingungen

Angegeben sind die für die Untersuchungen verwendeten Metallsalze sowie die jeweiligen Inkubationszeiten und -temperaturen.

Metallsalz	Zeit [h]	Temperatur [° C]
Pb(CH ₃ COO) ₂	1,5	70
FeCl ₃	1	25
MnCl ₂	1	70
NiCl ₂	2,5	70

Bei einigen Verbindungen kam es vor, dass die Absorption des gebildeten Komplexes, den Messbereich des Spektrometers überschritt. In diesen Fällen wurden die eingesetzten Mengen der Liganden- und der Salzlösung halbiert (50 µl bzw. 15 µl). Das geringere Volumen wurde

durch die Verwendung von 935 μl der Natriumacetat/Methanol-Mischung ausgeglichen. Bei dieser Variante wurden auch nur Lösungen mit einem Gehalt von 0,1 mM EDTA eingesetzt.

Bei der Aufnahme der Absorptionsspektren fand die Registrierung der einzelnen Absorptionswerte in einem Abstand von 10 nm statt. Deckte das Absorptionsmaximum eines Komplexes einen größeren Bereich ab, wurde für jede Wellenlänge in diesem Bereich ein K_D - bzw. pM-Wert berechnet und daraus ein Mittelwert gebildet. Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wurde die Analyse immer in doppelter Ausführung vorgenommen.^[124]

2.5.2 Auswertung

Zuerst wurde anhand der aufgenommenen Spektren des EDTA-freien Ansatzes die Wellenlänge λ_{max} ermittelt, bei der der gebildete Komplex die stärkste Absorption aufweist. Dann wurde wie folgt der Extinktionskoeffizient ε berechnet:

$$\varepsilon = \frac{Abs_{\text{max}}}{c_M}$$

Abs_{max} ist die Absorption bei der Wellenlänge λ_{max} und c_M die Konzentration des Metallkomplexes. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass alle in der Lösung befindlichen Kationen komplex gebunden sind. Da der Ligand immer im Überschuss zugegeben wurde, entspricht die Konzentration des Komplexes folglich der Kationenkonzentration. Durch Umstellung der Formel erhält man folgenden Ausdruck mit dessen Hilfe man die Konzentration des Komplexes c anhand der Absorption Abs berechnen kann:

$$c = \frac{Abs}{\varepsilon}$$

Für Abs setzt man nun die Absorption ein, die für den Ansatz mit EDTA gemessen wurde. Da die jeweiligen EDTA-Komplexe in den gemessenen Bereichen nicht absorbieren, rührt die gemessene Absorption nur von dem Komplex mit der Testsubstanz her. So erhält man dessen Konzentration und daraus ergibt sich wiederum die des EDTA-Komplexes. Aus den so ermittelten Daten kann man dann unter Verwendung folgender Formel den K_D berechnen:

$$K_D = \frac{K_{EDTA} \cdot [M(EDTA)] \cdot [L]^n}{[M(L)_n] \cdot [EDTA]}$$

$M(EDTA)$ und $M(L)_n$ stehen hierbei für den Komplex des Kations mit EDTA bzw. mit der Testsubstanz, $[M(EDTA)]$ und $[M(L)_n]$ folglich für die jeweiligen Konzentrationen, die im vorhergehenden Schritt berechnet worden waren. n entspricht der Zahl der Liganden, die zusammen mit dem Kation den Komplex bilden. K_{EDTA} ist die spezifische Bindungskonstante des Metall-EDTA-Komplexes. Die jeweiligen Werte sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Da K_{EDTA} vom pH-Wert abhängig ist und nur der Wert für pH 7,4 zur Verfügung stand, war es nicht möglich einen K_D für pH 5,5 zu berechnen. In diesem Fall wurde die Komplexkonzentration im Ansatz mit EDTA auf die im EDTA-freien Ansatz bezogen. Angegeben wurde der prozentuale Anteil.

Tabelle 2.2: Bindungskonstanten

In der Tabelle sind die jeweiligen Bindungskonstanten K_{EDTA} der EDTA-Komplexe der verwendeten Metallkationen sowie ihr negativer dekadischer Logarithmus aufgelistet.^[125]

Kation	K_{EDTA}	$-\log_{10}(K_{EDTA})$
Pb ²⁺	10^{-18}	18
Fe ³⁺	$5 \cdot 10^{-23}$	25,3
Ni ²⁺	$2,5 \cdot 10^{-19}$	18,6
Mn ²⁺	10^{-14}	14

Aus dem K_D -Wert lässt sich der pM-Wert ermitteln:

$$\text{pM} = -\log_{10}(K_D) \cdot [L]/[L]^{n-1}$$

L steht auch hier wieder für die Testsubstanz, $[L]$ für die eingesetzte Konzentration und n für die Ligandenanzahl.^[124, 126]

2.6 Das Glutathion-Monitoring

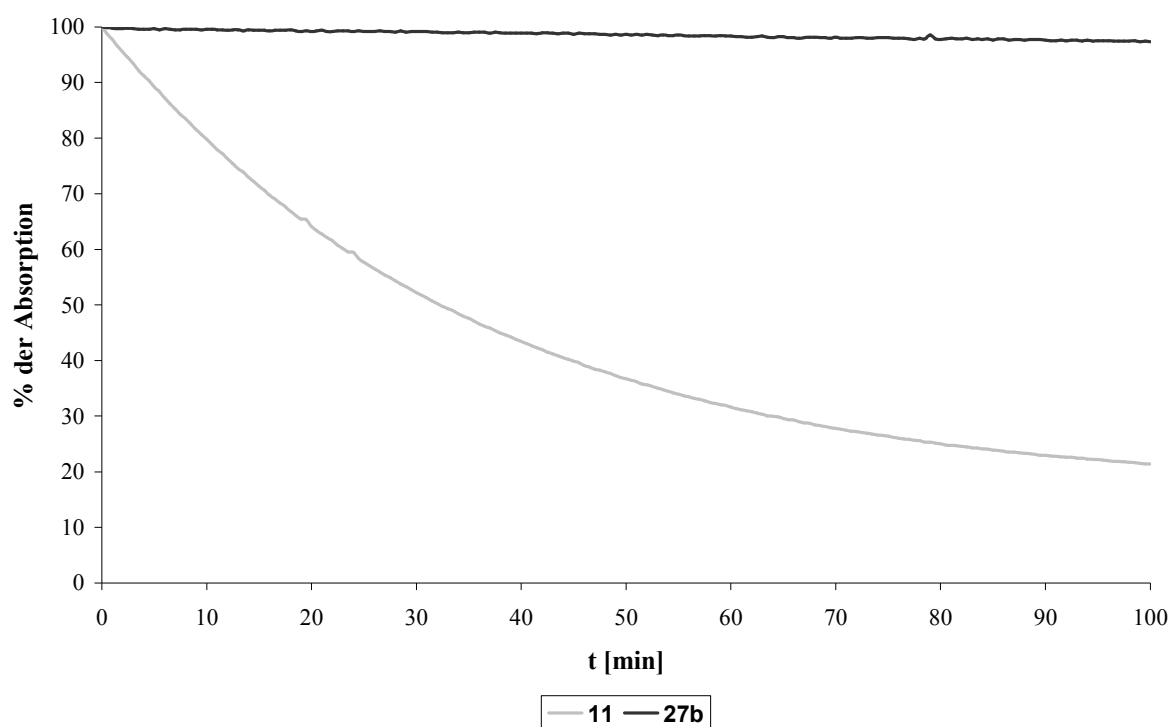
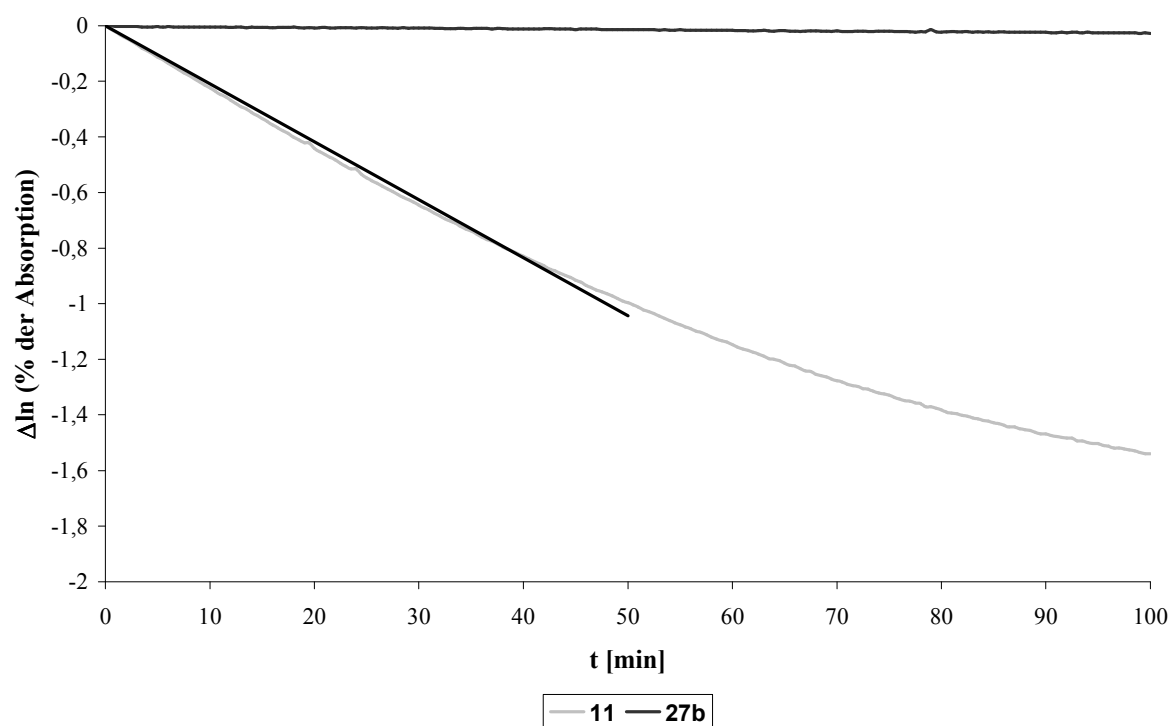
Wie eingangs erwähnt, ist **11** zu toxisch, als dass man es als wirkungsvolles Cytostatikum einsetzen kann (siehe 1.2.6). Ursache hierfür ist die hohe Reaktivität des Michael-Systems. Die relativ schnelle Bindung von Thiolen führt zu einer Aktivierung, noch bevor das eigentliche Ziel, die DNA, erreicht ist. Darüber hinaus kommt es bei diesem Vorgang durch die Reaktion mit Cysteinen auch zur Inhibierung wichtiger Proteine (siehe Abb. 1.24).^[81 - 85] Bei dem weniger toxischen Illudinderivat **11d** erfolgt die Aktivierung durch eine von der AOR katalysierte enzymatischen Reaktion, eine spontane Reaktion der Doppelbindung mit Thiolen kommt so gut wie nicht vor (siehe Abb. 1.25).^[86, 93, 94] Deshalb sollte man nach Testsubstanzen suchen, deren Michael-System langsamer, schlechter oder verzögert reagiert. Diese Derivate sollten eher mit den hypoxischen Tumorzellen interagieren als mit normalen Zellen. In der Praxis erfolgt diese Untersuchung, indem man die Testsubstanz zusammen mit dem Thiol Glutathion (GSH) in einer zell- und proteinfreien Pufferlösung inkubiert. Da die Doppelbindung am C8 ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 330 nm aufweist, ist es möglich ihre Reduktion anhand der Abnahme der Absorption in diesem Bereich zu verfolgen.

2.6.1 Durchführung

In einer Plastikkuvette wurden 32,5 µl einer 100 mM Stammlösung von GSH in PBS durch Zugabe von 457,5 µl PBS auf ein Volumen von 490 µl gebracht. Der Test wurde gestartet indem 10 µl einer 10 mM Lösung der Testsubstanz in DMF zugefügt wurden. Die Kuvette wurde sofort durch Invertieren durchmischt und in das Spektralphotometer gegeben. Die Endkonzentration an GSH betrug somit 6,5 mM, die der Testsubstanz 0,2 mM. Es erfolgte eine Aufzeichnung der Absorption bei 330 nm über einen Zeitraum von 100 min in halbminütigen Abständen. Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wurde diese Analyse in doppelter Ausführung vorgenommen.

2.6.2 Auswertung

Um vergleichen zu können, in welchem Ausmaß eine Reduktion der Doppelbindung stattfindet, wurde für jede getestete Verbindung eine prozentuale Abbaurate bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei $t = 0$ min gleich 100% gesetzt und die nachfolgenden Werte darauf bezogen. Es wurde der natürliche Logarithmus dieser prozentualen Werte ermittelt und ihre jeweilige Differenz zum Ausgangswert graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Für diesen Graphen wurde eine Ausgleichsgerade der Form $\Delta \ln P = -at$ bestimmt, mit der Differenz des Logarithmus des prozentualen Wertes $\Delta \ln P$, der Zeit in min t und der Abbaurate a . So lässt sich der prozentuale Anteil an Molekülen mit nichtreduzierter Doppelbindung P zu jedem Zeitpunkt t nach der Formel $P = e^{-at}$ ermitteln. Die Abbaurate a dient somit als Möglichkeit die einzelnen Substanzen untereinander zu vergleichen. Je größer die Abbaurate a ist, desto schneller reagiert die Doppelbindung mit GSH und desto größer ist die potentielle Toxizität der Verbindung. In Abb. 2.29 sind als Beispiel die ermittelten Graphen von Illudin M **11** und von **27b**, dem Ester von **11** mit Retinsäure, aufgeführt.

A**B****Abbildung 2.29: Auswertung des GSH-Monitorings**

In Teilbild A ist die prozentuale Absorptionsänderung (330 nm) in einem Testansatz mit **11** bzw. **27b** dargestellt. Teilbild B zeigt die Differenz des Logarithmus der Messwerte vom Nullwert. Für **11** wurde eine Ausgleichsgerade eingezeichnet. Hierbei wurde nur der lineare Bereich (0 bis 50 min) berücksichtigt.

2.7 Alkylierungsassays

Da die Wirkung von **11** darauf beruht, die DNA zu alkylieren, wurde ein Test durchgeführt, um diese Eigenschaft zu quantifizieren. Durch den Vergleich der alkylierenden Eigenschaften einzelner Illudin-Derivate wäre es so möglich, Rückschlüsse auf deren Aktivität zu ziehen. Nicotinamid **33** weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Basen der DNA auf. Es dient bei diesem Test als Substrat mit dem die Testsubstanz reagieren soll. Als Referenzverbindung wurde das bekannte Alkylanz Epichlorhydrin **34** verwendet. Durch die Alkylierung wird aus **33** das Zwischenprodukt **35** gebildet. Durch die Zugabe von Aceton **39** entsteht daraus im Alkalischen der photometrisch nachweisbare Farbstoff **38a** (siehe Abb. 2.30).^[127, 128] Es wurde auch eine Variante ausprobiert, bei der die Reaktion mit Acetophenon **39a** anstatt mit **39** abläuft. Das hierbei entstehende Produkt wird über seine Fluoreszenz nachgewiesen. Bei dieser Versuchsdurchführung sind darüber hinaus die Versuchsbedingungen näher an den physiologischen.^[129]

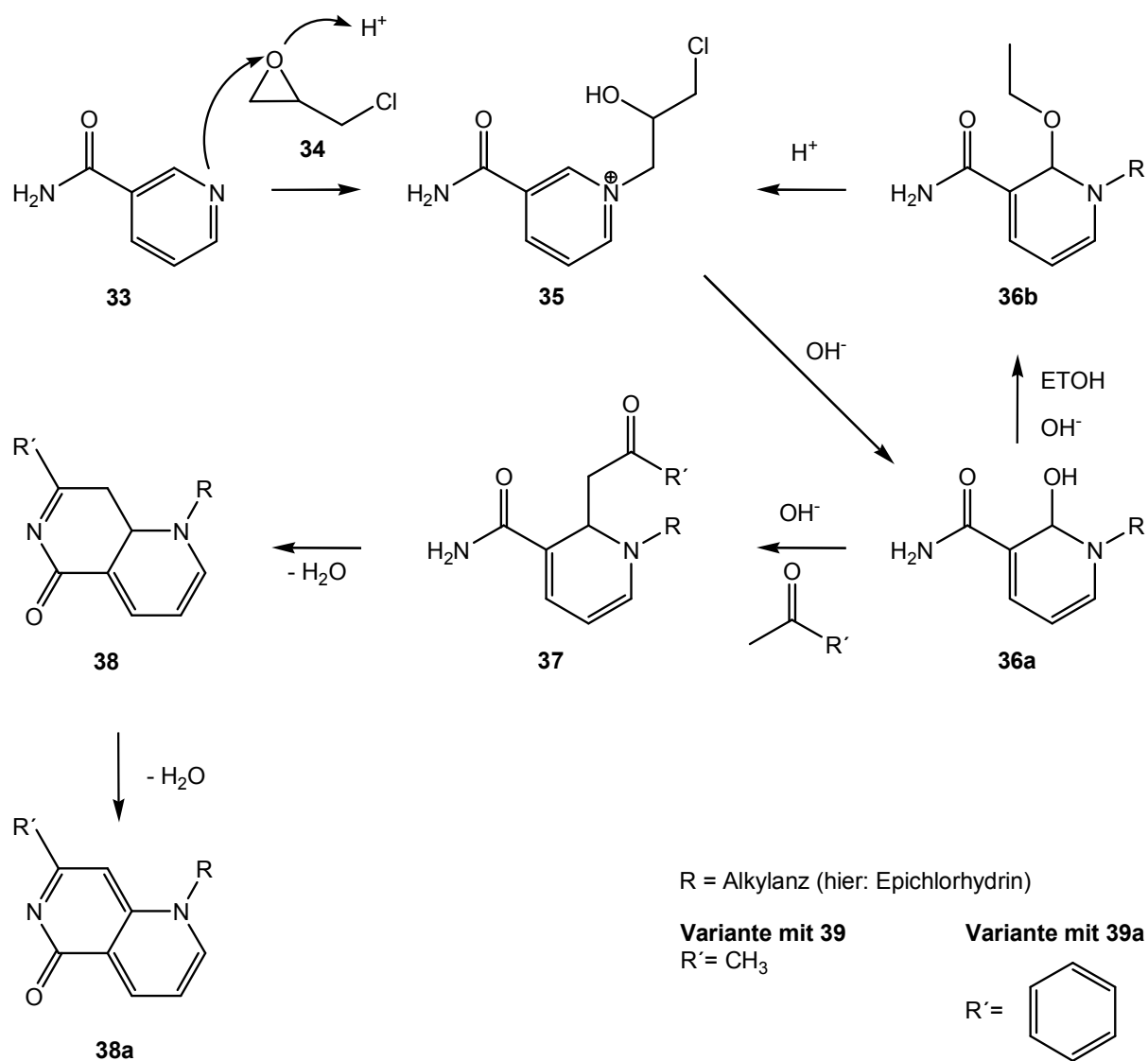


Abbildung 2.30: Ablauf des Alkylierungsassays am Beispiel von 34

Nicotinamid **33** wird von Epichlorhydrin **34** alkyliert. Das im alkalischen aus dem Zwischenprodukt **35** entstehende α -Carbinol **36a** wird unter Einbeziehung von **39** bzw. **39a** zum α -Addukt **37**. **37** wird unter Wasserabspaltung cyclisiert und aus dem Produkt **38** entsteht nach Deprotonierung das nachweisbare Fluorophor **38a**. Über den Übergangszustand **36b** ist auch eine Rückreaktion von **36a** zu **35** möglich.^[128]

2.7.1 Durchführung des Alkylierungsassays mit Aceton

Zu 225 µl 250 mM **33** in Alkylierungspuffer wurden 25 µl einer Lösung der jeweiligen Testsubstanz in DMF gegeben. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich zwischen 0,5 und 10 mM eingesetzt. Als Referenz diente DMF und als Positivkontrolle Epichlorhydrin **34** in DMF. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 60° C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde jeder Ansatz in einem Trockeneis-Aceton-Gemisch eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 125 µl Aceton **39** und 50 µl 6 M KOH zugefügt. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml bidestilliertem Wasser gestoppt, nach weiteren 11 min wurde die Absorption der Probe bei 358 nm gemessen. Da viele Illudinderivate eine Absorption in diesem Bereich aufweisen, wurde diese bei der entsprechenden Konzentration bestimmt und vom Messwert abgezogen. Um die Testsubstanzen untereinander vergleichen zu können, wurde der EC₅₀ bestimmt. Dabei handelt es sich um die Substanzkonzentration, die benötigt wird, um 50% des Substrats in einer vorbestimmten Zeit zu alkylieren. Dazu wurde für jede Testsubstanz ein Graph aus der Konzentration und der nach der Nachweisreaktion gemessenen Absorption erstellt. Für den Bereich, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption vorliegt, wurde eine Ausgleichsgerade der Form $Abs = ac$ erstellt. *Abs* steht hierbei für Absorption bei 358 nm und *c* für die Substanzkonzentration. Anhand dieser Gleichung wurde die Konzentration bestimmt, bei der die Absorption nach der Nachweisreaktion der Hälfte des maximal möglichen Wertes entspricht (siehe Abb. 2.31). Neben der Variation der Konzentration wurde zum Vergleich auch die Inkubationszeit bei einer konstanten Konzentration von 2 mM variiert. Um den Einfluss des Lösungsmittels zu bestimmen, wurde auch eine Lösung von **34** in DMSO betrachtet.^[127]

Alkylierungspuffer:

0,1 M Na₂HPO₄

7,1% Ethanol

in Aqua bidest.

pH 7,4

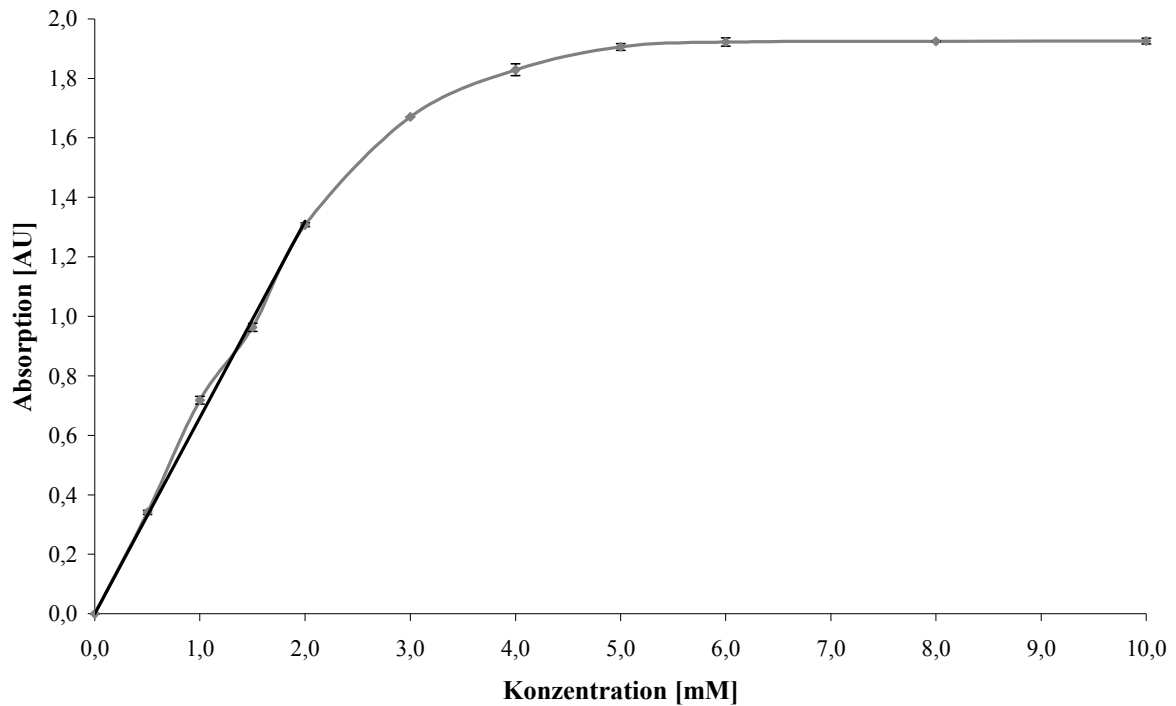


Abbildung 2.31: Bestimmung des EC_{50} am Beispiel von 34

In der Abbildung ist die bei der Nachweisreaktion gemessene Absorption (358 nm) gegen die eingesetzte Substanzkonzentration aufgetragen. Anfangs nimmt sie linear mit der Konzentration zu, dann wird eine maximale Absorption von 1,92 erreicht. Für den linearen Bereich ergibt sich ein Zusammenhang nach der Formel $Abs = 0,66c$ mit Absorption Abs und Konzentration c ($R^2 = 0,9959$). Aus der Gleichung kann man berechnen, dass die halbmaximale Absorption von 0,96 erreicht wird, wenn die eingesetzte Substanzkonzentration bei 1,45 mM liegt. Dieser Wert ist der EC_{50} .

2.7.2 Durchführung des Alkylierungsassays mit Acetophenon

10 µl einer 10 mM Lösung der Testsubstanz in DMSO wurden mit 65 µl 62,5 mM **33** in 0,0667 M Na₂HPO₄ (pH 7,4) gemischt und für 60 min bei 37° C inkubiert. Als Referenzsubstanz diente **34** in DMSO. Nach der Inkubation wurden 250 µl 15%iges **39a** und 250 µl frisch hergestellte 1 M KOH, beides in Ethanol, zugefügt und das Gemisch wurde auf Eis stengelassen. Nach 10 min wurden 1,5 ml Ameisensäure zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min gekocht und wieder auf Eis gegeben. Nach weiteren 3 min wurde die Probe mit dem Phosphatpuffer 1:10 verdünnt und es wurde über einen Zeitraum von 10 min die Fluoreszenz gemessen. Dies war notwendig, da kein fixer Messwert festgestellt werden konnte, sondern die Fluoreszenz mit der Zeit wieder abnahm. Die Anregungswellenlänge lag bei 370 nm, die Emission wurde bei 430 nm gemessen. Um auszuschließen, dass die gemessenen Werte von der Testsubstanz herrühren, wurde die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Verbindung bestimmt. Die Anregungswellenlängen lagen hierbei bei 350, 360, 370, 380 und 390 nm, der untersuchte Emissionsbereich verlief von 390 bis 490 nm. Untersucht wurden dabei 10 µl einer 10 mM Lösung der Substanz in DMSO in 2,065 ml des Phosphatpuffers. Da bei dieser Methode die Fluoreszenz und nicht die Absorption gemessen wird, ist es nicht möglich einen Sättigungswert festzustellen aus dem man den EC₅₀ bestimmen kann. Deshalb wurde hier anders vorgegangen: Zuerst wurde aus den über 10 min gemessenen Werten jeder Testverbindung ein Mittelwert bestimmt. Der Wert des Ansatzes mit 10 mM **34** wurde gleich 100% gesetzt, der der Referenz gleich 0%. Alle anderen Werte wurden darauf bezogen. Als Referenz diente DMSO, mit dem wie beschrieben verfahren wurde. DMSO wurde gewählt, um den Einfluss des Lösungsmittels möglichst gering zu halten. Als Musterverbindung fungierte nun Benzylbromid **40**, des Weiteren wurde das Illudinderivat **27n** untersucht.^[129]

2.8 Zellkultur

Die Zelllinie HL 60 ist eine promyelozytische Leukämiezelllinie, die 1977 von Collins eingeführt wurde. Die Zellen bilden kein p53 aus und die Apoptose lässt sich leicht induzieren. Das macht sie zu einem gut geeigneten und weit verbreiteten Modellorganismus für Screeningprozesse. Die Zellen stammen ursprünglich von einer 36 Jahre alten Patientin. In undifferenzierter Form wachsen sie permanent in Suspensionskultur mit einer Verdopplungszeit von 24 h, differenzieren aber vergleichsweise schnell aus. Die Anzucht erfolgte aus gefrorenen Zellen (-80° C), die von der DSMZ bezogen wurden (ACC3, LOT14).^[130] Bei der Zelllinie 518 A2 handelt es sich um eine humane Melanomzelllinie. Sie wächst adhärent mit einer Verdopplungszeit von 24 h. Die Zellen wurden uns als wachsende Kultur von Dr. Reinhard Paschke vom Biocenter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg überlassen.^[131] Die adhärent wachsende Zelllinie Kb-V1 ist eine humane Gebärmutterhalskrebszelllinie. Sie weist ausgeprägte Resistenzen gegenüber Vinblastin, Doxorubicin und Taxol auf, die im Vorhandensein von Pgp-Transportproteinen begründet sind. Da diese Transporter mit der Zeit verloren gehen können, wurde dem Medium Vinblastin zugesetzt. Die wachsende Kultur wurde uns von Prof. Dr. Günther Bernhardt von der Universität Regensburg überlassen.^[132, 133] Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 ist ebenfalls adhärent wachsend. Sie zeichnet sich durch eine Resistenz gegenüber Topotecan und Mitoxantron aus, wofür der BCRP-Transporter verantwortlich ist. Um zu verhindern, dass die Zellen die Transportproteine verlieren, wurde Topotecan in das Medium gegeben. Des Weiteren weist diese Zelllinie gut ausgeprägte Estrogen-Rezeptoren auf, was sie als Modellorganismus für Estrogen-gekoppelte Wirkstoffe besonders interessant macht. Auch diese Zellen erhielten wir als wachsende Kultur von Prof. Dr. Günther Bernhardt, Universität Regensburg.^[134, 135] Die adhären HT-29-Zellen sind humane Darmkrebszellen, die ein weit gefächertes Spektrum an Resistenzen zeigen. Sie wurden uns als wachsende Kultur von Prof. Dr. Matthias Ocker, Universität Marburg, überlassen.^[136] Mikroskopische Aufnahmen aller erwähnten Zelllinien sind in Abb. 2.32 zu sehen.

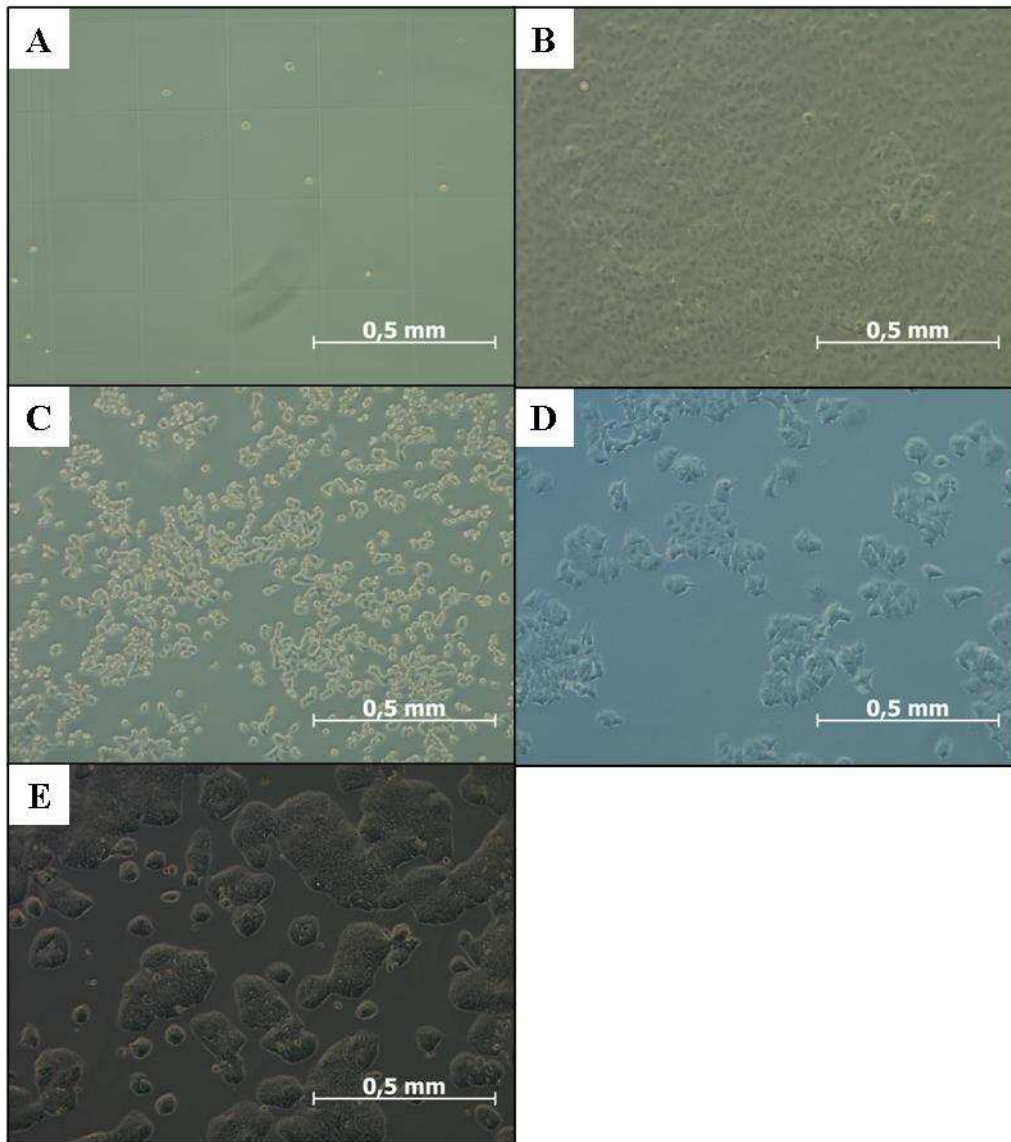


Abbildung 2.32: Bilder der Zellkulturen

Teilbild A zeigt eine mikroskopische Aufnahme der HL 60-Zellen, Teilbild B eine der 518 A2, Teilbild C eine der Kb-V1, Teilbild D eine der MCF-7 und Teilbild E eine der HT-29. Ein Maßstabsbalken ist jeweils mit angegeben. In den Abbildungen der adhärenenten Zellen 518 A2, MCF-7 und HT-29 (B, D und E) sind konfluente Zellen zu sehen. Die abgebildeten Kb-V1-Zellen (C) befinden sich noch im Wachstum. Im konfluenten Zustand sind sie kaum von den 518 A2 zu unterscheiden.

2.8.1 Kultivierung der Suspensionskulturzellen HL 60

Die Kultivierung der HL 60-Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit Filterkappe bei 37° C im Brutschrank. Dort herrschte eine Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Das verwendete Kulturmedium war das RPMI-Medium. Alle Arbeitsschritte mit den Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Cleanbench. Die Zellkonzentration wurde immer in einem Bereich von $0,5-2,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml gehalten. Um dies zu gewährleisten wurde zur Verdünnung neues Medium hinzugefügt oder es fand ein kompletter Wechsel des Mediums durch Zentrifugation statt. Dazu wurde die Zellsuspension 10 min bei 1200 rpm (330·g) zentrifugiert, dann wurde das alte Medium abdekantiert und durch eine entsprechende Menge neues Medium ersetzt. Die Zellen wurden wieder in Suspension gebracht und es folgte die Bestimmung der Zellzahl sowie deren Einstellung auf eine geeignete Konzentration. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, betrachtet wurde eine Probe der Suspension 1:10 mit PBS verdünnt. Es wurden jeweils 8 µl der Verdünnung auf die beiden Zählflächen aufgetragen. Die Auszählung der Zellen erfolgte in den 4 Eckquadraten der beiden Zählflächen, die in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilt waren. Anschließend wurde der Mittelwert der Eckquadrate gebildet. Dieser mit 10^5 multipliziert ergab die Konzentration der Zellen pro ml (siehe Abb. 2.33).^[137 - 139]

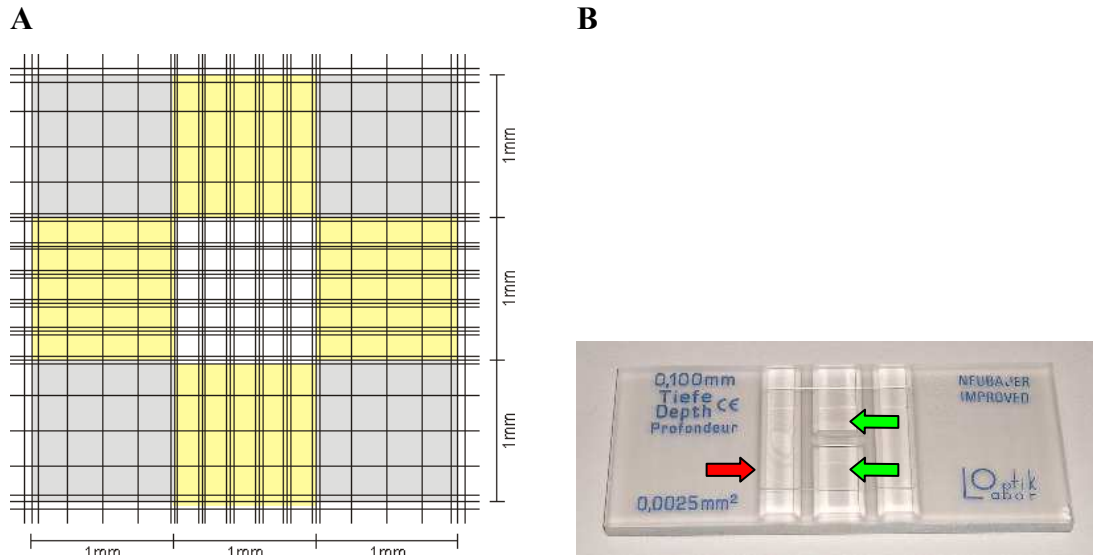


Abbildung 2.33: Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer

In Teilbild A ist das in die Neubauer-Zählkammer eingezätzte Muster dargestellt, mit dessen Hilfe es möglich ist, die Zellkonzentration zu bestimmen. Die Eckquadrate zur Bestimmung der Zellzahl sind hellgrau markiert. Die Zellen in diesen Bereichen wurden gezählt, dann wurde der Mittelwert bestimmt. Nimmt man diesen mal 10^4 erhält man die Zellzahl in der untersuchten Verdünnung. Daraus lässt sich dann die Zellkonzentration in der Kultur berechnen. In Teilbild B ist eine vollständig zusammengesetzte Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen zu sehen. Man kann schwach die Newtonschen Ringe erkennen, ein Zeichen dafür, dass das Deckgläschen passend aufsitzt (roter Pfeil). Die beiden grünen Pfeile deuten auf die Flächen, wo sich die Gitternetze befinden. Über diesen existiert ein Zwischenraum zwischen Zählkammer und Deckgläschen, in den die Zellsuspension gegeben wird. Bild aus ^[140]

RPMI-Medium:

500 ml	RPMI 1640
55 ml	FBS,
2,75 ml	Gentamycin
5,5 ml	Antibiotic-Antimycotic (Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B)

2.8.2 Kultivierung der adhärenenten Zellen 518 A2

Auch die 518 A2-Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bei 37° C kultiviert. Als Kulturmedium wurde das DMEM-Medium genutzt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie passagiert und anschließend weiter kultiviert. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 3 ml der auf 37° C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Die Kulturflasche wurde dann im Brutschrank aufbewahrt, bis sich alle Zellen vom Flaschenboden lösten. Um eine weitere Aktivität des Trypsins zu unterbinden, wurden 7 ml Medium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Dann wurde das alte Medium verworfen und die Zellen in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl wie unter 2.8.1 beschrieben. Zum Animpfen einer neuen Kultur wurden 10⁵ Zellen in eine Flasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² gegeben und 13 ml Medium zugefügt. Nun wuchsen die Zellen, bis sie wieder konfluent waren (5 bis 7 Tage). Wurden Zellen früher benötigt, wurde die Zahl der ausgesäten Zellen dementsprechend erhöht. Während des Wachstums fand je nach Bedarf ein Wechsel des Mediums statt. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und anschließend durch 13 ml neues Medium ersetzt.^[137 - 139]

DMEM-Medium:

500 ml	DMEM
55 ml	FBS,
2,75 ml	Gentamycin
5,5 ml	Antibiotic-Antimycotic

2.8.3 Kultivierung der adhärenenten Zellen Kb-V1

Die Kultivierung der Kb-V1-Zellen erfolgte analog zu der unter 2.8.2 beschriebenen Kultivierung der 518 A2-Zellen. Zum Animpfen einer neuen Kultur wurden bei einer Wachstumsfläche von 75 cm² jedoch mindestens $2 \cdot 10^5$ Zellen herangezogen. Nach 3 bis 4 Tagen wurde dem Medium soviel von einer 100 µM Stammlösung von Vinblastin in Ethanol zugegeben, dass die Endkonzentration 340 nM betrug.^[137 - 139]

2.8.4 Kultivierung der adhärenenten Zellen MCF-7

Auch bei den MCF-7-Zellen erfolgte die Kultivierung wie bei den 518 A2-Zellen (siehe 2.8.2). Da die Zellen empfindlich gegenüber Antibiotika sind, wurde das EMEM-Medium verwendet. Mindestens 10% der Zellen, die bei einer Passage anfielen, wurden zum Ansetzen einer neuen Kultur in einer gleichgroßen Flasche verwendet und es wurde eine entsprechende Menge an Medium hinzugefügt. Nach 3 bis 4 Tagen Wachstum wurde dem Medium soviel von einer 100 µM Stammlösung von Topotecan in Ethanol zugefügt, dass eine Endkonzentration von 550 nM erreicht wurde. Eine Passage erfolgte, sobald der größte Teil der Zellen begann, in zusammenhängenden Aggregationen zu wachsen.^[137 - 139]

EMEM-Medium:

1l	EMEM
50 ml	FBS
2,2 g	NaHCO ₃
110 g	Natriumpyruvat

2.8.5 Kultivierung der adhärenenten Zellen HT-29

Auch die Aufzucht der HT-29-Zellen erfolgte entsprechend der Kultivierung der 518 A2-Zellen (siehe 2.8.2). Als Medium wurde das RPMI-Medium genutzt (siehe 2.8.1). Eine Passage erfolgte, sobald der größte Teil der Zellen begann, in zusammenhängenden Flächen zu wachsen und man keine einzelnen Zellen mehr erkennen konnte.^[137 - 139]

2.8.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für den Fall, dass die verwendeten Zellen nicht mehr zu gebrauchen waren, wurden von gut wachsenden Kulturen Rückstellproben genommen und eingefroren. Diese Prozedur war für jede Zelllinie gleich. Suspensionszellen wurden dazu abzentrifugiert, adhärente Zellen wie beschrieben passagiert. Die Zellen wurden dann im entsprechenden Medium in einer Konzentration von $2\text{-}3 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Der Suspension wurden 155 µl FBS und 127 µl DMSO pro ml Medium zugefügt. Letzteres war zu diesem Zweck vorher sterilfiltriert oder UV-sterilisiert worden. Aliquots zu je 1,8 ml wurden in Cryotubes überführt und für 1 h auf Eis gelassen. Anschließend wurden sie in eine mit Isopropanol befüllte Einfrierkammer gestellt, die dann für mindestens 90 min in einem Gefrierschrank mit -80°C gegeben wurde. Durch diese Kammer wurde ein langsames Abkühlen mit einer Rate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ sichergestellt. Nachdem die Cryotubes eine Temperatur von -80°C erreicht hatten, wurden sie bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Wurden die eingefrorenen Zellen wieder gebraucht, wurde wie folgt vorgegangen: Es wurden – je nach Bedarf – ein bis drei Cryoröhrchen einer Charge im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und pro verwendetes Tube wurden 10 ml vorgewärmtes Medium zugefügt. Anschließend wurde abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm). Dies diente dazu, das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen, da es schädlich für die aufgetauten Zellen ist. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen wieder in dem entsprechenden Medium resuspendiert und in einer passenden Zellkulturflasche in den Brutschrank überführt. Hierbei wurde die Aussaatkonzentration deutlich höher angesetzt um ein ausreichendes Wachstum zu gewährleisten. Um sicherzustellen, dass die Nachwirkungen des Auftauvorgangs nicht die Versuchsergebnisse beeinflussen, wurde mindestens zwei Wochen gewartet, bevor man erste Untersuchungen an den Zellen anstellte.^[137 - 139]

2.9 Der TUNEL-Test

Beim kontrollierten Zelltod kommt es – anders als bei den meisten Fällen der Nekrose – zu einer Zerstückelung der DNA. Dieses Phänomen macht man sich zu Nutze, um beim TUNEL-Test (TdT-mediated dUTP nick end labeling) apoptotische Zellen nachzuweisen. Dabei werden mit Fluorescein markierte dUTP-Nukleotide vom Enzym Terminale Transferase an die freien 3'-Enden der DNA angehängt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert (siehe Abb. 2.34). Nur bei der DNA apoptotischer Zellen liegen genug freie Enden vor, um eine messbare Fluoreszenz zu ergeben. Da es in seltenen Fällen vorkommen kann, dass auch nekrotische Zellen einen positiven TUNEL-Test ergeben, wurde immer auch die äußere Form der Zellen betrachtet.^[141 - 143]

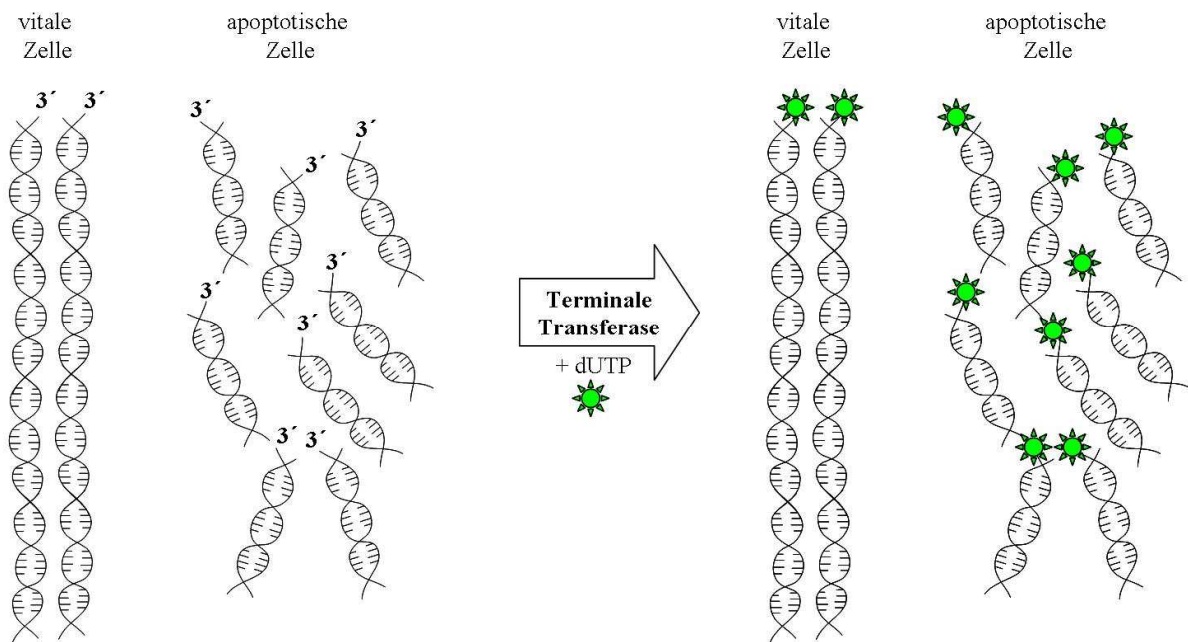


Abbildung 2.34: Prinzip des TUNEL-Tests

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung wie mit Fluorescein markierte dUTP-Nukleotide vom Enzym Terminale Transferase an freie 3'-Enden der DNA angehängt werden. Bei apoptotischen Zellen liegt die DNA fragmentiert vor, so dass viel mehr freie Enden zur Verfügung stehen und man deshalb auch ein viel deutlicheres Fluoreszenzsignal erhält.^[141 - 143]

2.9.1 Der TUNEL-Test mit HL 60-Zellen

Für den Test mit den Suspensionskulturzellen HL 60 wurden 2,25 ml einer Suspension mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in eine sterile Petrischale aus Glas gegeben. Nach Zugabe von 250 μ l der Testlösung folgte eine Inkubation von 16 h bei 37° C. Zur Herstellung der Testlösung wurde eine 10 mM Stammlösung in DMF mit PBS auf 100 μ M verdünnt. Die Endkonzentration im Ansatz betrug somit 10 μ M. Als Positivkontrollen fungierten das bereits in der Medizin etablierte Cisplatin **1** und das Menthol-Platinkomplekonjugat **13a**, der bei anfänglichen Tests eine gute proapoptische Wirkung aufwies. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Die Testverbindungen wurden so ausgewählt, dass der IC₅₀-Wert unter 50 μ M lag. Nach der Inkubation wurden je 2 ml der Zellsuspension in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 2100 rpm (300·g) abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte. Dabei wurden die Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und anschließend erneut 10 min bei 300·g abzentrifugiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 200 μ l einer frischen Fixierlösung (2% Formalin in PBS) suspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde erneut zwei Mal gewaschen, dann wurden die Zellen als Spot auf einen Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Um die Zelldichte zu erhöhen wurde je nach Bedarf nach dem Eintrocknen eine weitere Schicht der Zellsuspension aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde der Objektträger gewaschen. Dies erfolgte wie alle nachfolgenden Waschschrte auf einem Schüttler durch zehnminütiges Übersichten mit PBS. Die Zellen wurden danach mit frischer Permeabilisierungslösung (0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat) überschichtet und für 2 min auf Eis inkubiert. Es wurde weitere zwei Mal gewaschen, dann wurden die Zellen mit 10 μ l des frisch zubereiteten TUNEL-Reaktionsmix (Testkit von Roche) bedeckt und für 45 min im Brutschrank inkubiert. Der Mix bestand aus einem Teil der Enzymlösung und 9 Teilen der Fluorescein-Lösung. Diese Bestandteile waren vor der Verwendung aliquotiert worden, da ein häufiges Einfrieren und Auftauen die Komponenten schädigen kann. Nach der Inkubation wurden zwei weitere Waschschrte durchgeführt und anschließend erfolgte die Betrachtung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Dazu wurden je nach Zelldichte vier bis sechs Bilder pro Testsubstanz aufgenommen und zwar je Ausschnitt jeweils ein Hellfeldbild und ein Bild im grünen Fluoreszenzbereich. Die Anregungswellenlänge lag hierbei zwischen 450 und 500 nm, die Fluoreszenz im Bereich von 515 bis 565 nm. Zur Auswertung wurde die Zahl der grün fluoreszierenden und der nicht fluoreszierenden Zellen bestimmt und jeweils von allen Bildern eines Versuchstages summiert. Dann wurde daraus der prozentuale Anteil der grün

fluoreszierenden, also apoptotischen Zellen, an der Gesamtzellzahl berechnet. Aus den ermittelten Werten von drei bis vier unabhängigen Versuchen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet.^[144]

2.9.2 Eine Variante des TUNEL-Tests mit HL 60-Zellen

Bevor die unter 2.9.1 beschriebene Durchführungsvariante etabliert wurde, wurde eine Methode ausprobiert, die auf der Gebrauchsanweisung zu dem Testkit beruht. Die Inkubation war identisch, ebenso die ersten Schritte des eigentlichen Tests. Es wurden allerdings immer drei anstatt zwei Waschvorgänge durchgeführt. Die Fixierung erfolgte, indem die Zellen in 200 µl einer frischen Fixierlösung aus 4% Paraformaldehyd in PBS suspendiert und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt wurden. Die Zellen wurden danach noch nicht auf einen Objektträger aufgebracht, alle folgenden Schritte fanden in Suspension statt. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in der frischen Permeabilisierungslösung suspendiert und 2 min auf Eis stehen gelassen. Die Markierung wurde vorgenommen, indem die Zellen in 25 µl des frisch zubereiteten TUNEL-Reaktionsmix suspendiert für 30 min im Brutschrank inkubiert wurden. Erst nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in einer geeigneten Menge PBS resuspendiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Auswertung sollte wie unter 2.9.1 beschrieben stattfinden.^[143]

2.9.3 Der TUNEL-Test mit adhärenenten Zellen

Für den TUNEL-Test mit den adhärenenten Zellen 518 A2, Kb-V1 und HT 29 wurden je $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 1,5 ml Medium in die Wells einer sterilen 6-Well Mikrotiterplatte gegeben. Man ließ die Zellen für einige Stunden anwachsen, dann wurden 167 µl der Testlösung hinzugefügt. Deren Herstellung erfolgte wie in 2.9.1 beschrieben. Bei den Brustkrebszellen MCF-7 wurden jeweils 2 Wells pro Testsubstanz verwendet, um die geringere Menge an zur Verfügung stehenden Zellen pro Well auszugleichen. Zudem ließ man die Zellen für mindestens 24 h anwachsen, bevor die Testsubstanzen appliziert wurden. Nach 16 h Inkubation bei 37° C wurde das Medium abgenommen und es folgte ein kurzer Waschschrift. Dabei wurden die Zellen mit 150 µl PBS überschichtet, das gleich darauf wieder entfernt und zu dem abgenommenen Medium gegeben wurde. Die adhärenenten Zellen wurden mit

150 μ l Trypsin-EDTA gelöst, eine weitere Trypsin-Aktivität wurde anschließend durch die Zugabe des abgenommenen Mediums unterbunden. Die gesammelten Zellen wurden 10 min bei 300·g abzentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie in 2.9.1 beschrieben, nur die Inkubation mit dem Testkit dauerte 1 h. Um bei den MCF-7-Zellen Zellverlust und Zellschädigung zu minimieren, wurde nach dem Ernten der Zellen und nach ihrer Fixierung mit Formalin jeweils nur ein Waschschrift durchgeführt.^[144] Bei einer alternativen Methode wurden 10^6 Zellen in 5 ml Medium in eine sterile Petrischale gegeben und nach dem Anwachsen mit 555 μ l der Testlösung versetzt. Zum Waschen und Trypsinieren wurden jeweils 1 ml PBS bzw. Trypsin-EDTA verwendet. Diese Methode wurde aber aufgrund des größeren Verbrauchs an Medium aufgegeben.^[144] Wie beim Test an den HL 60-Zellen wurden auch hier die Verbindungen so gewählt, dass der IC₅₀-Wert unter 50 μ M lag. Bei dem Oxazolsulfon **26f** wurde festgestellt, dass diese Substanz in Verbindung mit dem Inhibitor MK 571 eine deutlich stärkere cytotoxische Wirkung an den HT 29-Zellen aufweist, weshalb auch eine kombinierte Verabreichung der beiden Wirkstoffe untersucht wurde.^[108, 145] Hierzu wurde MK 571 in einer Endkonzentration von 10 μ M 24 h vor der Zugabe von **26f** zu den Zellen gegeben.

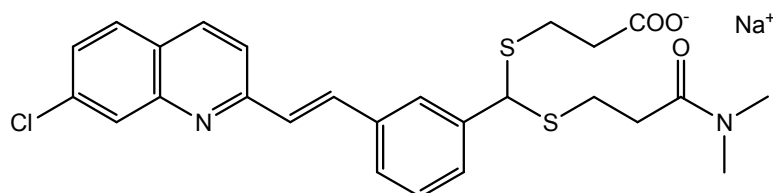


Abbildung 2.35: MK 571, ein Inhibitor des Rezeptors CysLT₁^[145, 146]

2.10 Der Annexin-Test

Der Annexin-Test nutzt die Tatsache aus, dass bei der Apoptose Phosphatidylserin-Reste, die sich bei vitalen Zellen an der Innenseite der Zellmembran befinden, auf die Außenseite verlagert werden. Dadurch werden sie zugänglich für den Marker, mit Fluorescein gekoppeltes Annexin. Da bei der Nekrose Löcher in der Zellmembran entstehen, sind die Phosphatidylserin-Reste auch hier für den Marker erreichbar, weshalb man zusätzlich noch Propidiumiodid einsetzt. Dabei handelt es sich um einen rot fluoreszierenden Farbstoff, der in die DNA interkaliert und die intakten Membranen vitaler und apoptotischer Zellen nicht durchdringen kann (siehe Abb. 2.36 und Abb. 2.37).^[36, 147]

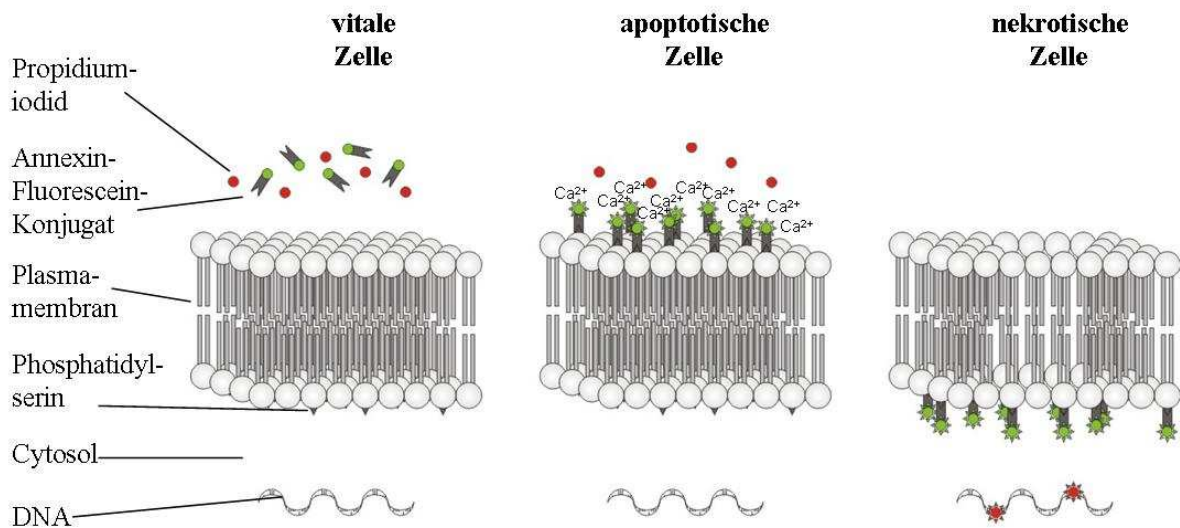


Abbildung 2.36: Prinzip des Annexin-Tests

Bei lebensfähigen Zellen sitzen die Phosphatidylserin-Reste an der Innenseite der intakten Zellmembran. Die Marker können sie nicht erreichen und man kann keine Fluoreszenz feststellen. Bei der Apoptose wandern sie auf die Außenseite und werden somit für das Annexinkonjugat zugänglich. Es tritt Grünfluoreszenz auf. Bei der Nekrose entstehen Löcher in der Zellmembran, der Marker kann in die Zelle eindringen und dort an das Phosphatidylserin binden. Da auch das Propidiumiodid eindringen und interkalieren kann, kann man sowohl grüne als rote Fluoreszenz erkennen.^[36, 147]

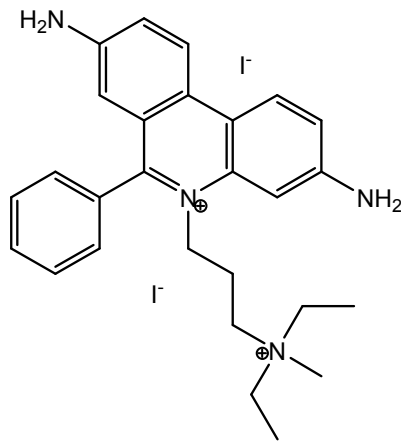


Abbildung 2.37: Propidiumiodid

Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Propidiumiodid, einem rot fluoreszierenden Farbstoff, der in die DNA interkalieren kann.^[148]

Daher gilt: Zellen, die grün und rot fluoreszieren, haben zerstörte Membranen, sind also nekrotisch. Zellen, die nur grün fluoreszieren, haben intakte Membranen und Phosphatidylserin-Reste auf der Außenseite, sind also apoptotisch. Zellen die nicht fluoreszieren haben intakte Membranen und das Phosphatidylserin befindet sich auf der Innenseite der Membran. Sie sind vital. Da es auch bei spätapoptotischen Zellen zu einer Zersetzung der Zellmembran kommen kann, sind diese nicht von nekrotischen Zellen zu unterscheiden.^[147, 149]

2.10.1 Der Annexin-Test mit HL 60-Zellen

900 µl einer Suspension mit $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden in einer sterilen Petrischale aus Glas vorgelegt. Es wurden 100 µl der Testlösung zugegeben und der Ansatz für 6 h bei 37° C inkubiert. Die Herstellung der Testlösung erfolgte wie unter 2.9.1 beschrieben, die Endkonzentration im Ansatz betrug 10 µM. Als Positivkontrollen wurden wieder **1** und **13a**, als Negativkontrolle PBS verwendet. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension für 10 min bei 2100 rpm (300·g) abzentrifugiert und es wurden zwei Waschschriffe vorgenommen (vgl. 2.9.1). Das Zell-Pellet wurde danach in 25 µl einer frisch hergestellten Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung (Testkit von Roche) resuspendiert und für 10 bis maximal 12 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung bestand aus 2% Annexin-FLOUS-Lösung und 2% Propidiumiodid-Lösung in dem mitgelieferten Puffer. Sie wurde bis zur Verwendung im Dunkeln auf Eis gelagert. Nach der Behandlung mit der Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung fand die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Zellen statt. Dazu wurden je nach Zelldichte vier bis sechs Bilder pro Testsubstanz abgelichtet. Von dem jeweiligen Ausschnitt wurden dabei ein Hellfeldbild und je eines im grünen und roten Fluoreszenzbereich aufgenommen. Die Anregungswellenlänge für Annexin-V-FLOUS lag hierbei zwischen 450 und 500 nm, die gemessene Fluoreszenz im Bereich von 515 bis 565 nm. Das interkalierte Propidiumiodid wurde im Bereich um 535 nm angeregt, das Fluoreszenzmaximum liegt bei 617 nm. Ähnlich wie beim TUNEL-Test wurde der prozentuale Anteil der grün fluoreszierenden, grün und rot fluoreszierenden und der nicht fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt (vgl. 2.9.1). Die Daten aus drei bis vier unabhängigen Versuchen wurden dann zur Bildung von Mittelwert und Standardabweichung herangezogen. Bei einer Variante des Tests wurde für ausgewählten Substanzen die Inkubationszeit auf bis zu 4 h herabgesetzt und die eingesetzte Endkonzentration dem jeweiligen IC₅₀ für 24 h angeglichen.^[147, 149]

2.10.2 Der Annexin-Test mit 518 A2-Zellen

Es wurden mehrere Methoden ausprobiert um den Annexin-Test mit adhärennten Zellen durchzuführen. Als Musterzelllinie diente bei all diesen Versuchen die Melanomzelllinie 518 A2.

2.10.2.1 Der Annexin-Test mit trypsinisierten Zellen

Es wurden 10^6 Zellen in 5 ml Medium in eine Petrischale gegeben. Als sie eine zum Passagieren geeignete Dichte erreicht hatten, wurden 555 μ l einer 100 μ M Testlösung hinzugefügt. Nach einer sechsstündigen Inkubation bei 37° C wurde das Medium abgenommen und die zurückbleibenden Zellen wie in 2.9.3 beschrieben passagiert. Dabei wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-EDTA gelöst und die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von 2 ml Medium unterbunden. Der jeweilige Überstand, die Waschlösung (PBS) und die abgelösten Zellen wurden vereinigt und 10 min bei 300·g abzentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie in 2.10.1 beschrieben. ^[147, 151]

2.10.2.2 Der Annexin-Test mit collagenbeschichteten Objektträgern

Es wurde auch versucht, den Test unter Verwendung eines Trägermediums durchzuführen, auf dem ein Wachstum adhärenter Zellen möglich war und das man unter dem Mikroskop betrachten konnte. Hierfür wurden Objektträger verwendet, die mit Collagen beschichtet wurden. Zur Herstellung der Collagenlösung wurden 0,1% (w/v) Collagen in 0,1 M Essigsäure gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt und über Nacht bei 4° C vorsichtig gerührt. Anschließend wurde sie in Greiner-Röhrchen überführt und für 4 h bei 3000 rpm (2000·g) abzentrifugiert. Objektträger wurden in Petrischalen gelegt und mit dem erhaltenen Überstand vollständig bedeckt. Die Schalen wurden für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann wurde der Überschuss abgenommen und für weitere Anwendungen aufgehoben. Die Collagenlösung wurde immer bei -20° C gelagert. Die beschichteten Objektträger wurden 1-2 Tage lang luftgetrocknet, dann über Nacht mit Hilfe von UV-Licht sterilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert. ^[137, 139]

Für den Test wurden je 10^5 Zellen in 9 ml Medium in die Petrischalen mit den beschichteten Objektträgern gegeben. Die Zellen auf den Objektträgern wuchsen nun bis sie eine mittlere Dichte erreicht hatten, dann wurde durch Zugabe von 1 ml der Testlösung eine Substanzkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ eingestellt. Nach der Inkubation von 6 h bei 37°C wurde das Medium verworfen und es folgte ein Waschschriff, bei dem die Zellen mit PBS überschichtet und für 10 min geschüttelt wurden. Danach wurden $30\ \mu\text{l}$ der Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für 10 min in der Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.^[147]

2.10.2.3 Der Annexin-Test mit Chamber Slides

Als Alternative zu den mit Collagen beschichteten Objektträgern, wurden zur Anzucht auch gekaufte, sterile Chamber Slides aus Permanox getestet. Dabei handelt es sich um ein spezielles Material, das das Wachstum von adhärenenten Zellen ermöglicht. Zudem weisen diese Objektträger einen abnehmbaren Rand auf, so dass man die Zellen zuerst mit Medium überschichten und nach Entfernung des Randes problemlos mikroskopieren kann (siehe Abb. 2.38).^[152]

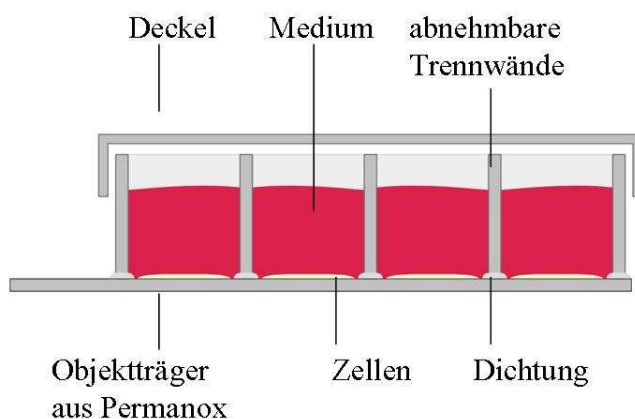


Abbildung 2.38: Chamber Slide

Durch die auf dem Objektträger angebrachten Wände entstehen Kammern, die man mit Zellkulturmedium befüllen kann. So kann man adhärenente Zellen direkt auf dem Objektträger züchten. Zur mikroskopischen Betrachtung kann man die Wände abnehmen und ein Deckgläschen auflegen.^[152]

In die einzelnen Kammern einer 4-Well Chamber Slide von Nunc wurden je 10^5 Zellen in 0,5 ml Medium gegeben. Nach 24 h Wachstum wurde die Testsubstanz zugegeben, die Endkonzentration betrug wieder $10\ \mu\text{M}$. Es folgte eine Inkubation von 6 h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden Medium und Wände entfernt und die Zellen per Überschichtung mit PBS gewaschen. Dann wurden $10\ \mu\text{l}$ der Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung. Auch der abgenommene Überstand wurde untersucht. Dessen Behandlung erfolgte analog zu den Suspensionszellen (siehe 2.10.1), allerdings wurde das Zell-Pellet vor dem Mikroskopieren nur in $10\ \mu\text{l}$ der Annexin-FLUOS/Propidiumiodid-Lösung suspendiert.^[147]

2.10.2.4 Der Annexin-Test mit Mikrotiterplatten

Parallel zu der unter 2.10.2.3 beschriebenen Variante unter Verwendung der Chamber-Slides wurde auch die Anzucht in 6-Well Mikrotiterplatten ausprobiert. Dafür wurden 10^5 Zellen in 1,8 ml Medium in die einzelnen Wells gegeben. Nach dem Anwachsen wurden $200\ \mu\text{l}$ der Testsubstanz zugegeben, so dass eine Endkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ erreicht wurde. Die weiteren Schritte sowie die Untersuchung des Überstands erfolgten wie unter 2.10.2.3 beschrieben. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden die Zellen ohne Deckgläschen betrachtet.^[147]

2.11 Der Immunoblot

Die Apoptose ist ein komplexer Vorgang, bei dem eine Vielzahl von Signalwegen eine Rolle spielt und die auf verschiedene Arten ausgelöst werden kann (siehe 1.1.4). Um festzustellen, über welchen Weg eine Verbindung die Apoptose initiiert, bedient man sich dem Immunoblot. Dazu werden behandelte Zellen aufgeschlossen, die Zellproteine mittels SDS-PAGE getrennt, per Western Blot auf eine Membran gebracht und schließlich sichtbar gemacht. Die Untersuchungen beschränkten sich hierbei auf die Caspase 9, das zentrale Enzym des intrinsischen Initiationswegs. Deren Nachweis erfolgte durch Antikörper, die an die 35 kDa schwere Untereinheit der Caspase 9 binden. Da dadurch sowohl die aktive als auch die inaktive Form markiert werden, ist es möglich, den zeitlichen Verlauf der Prozessierung dieses Proteins zu verfolgen. So erhält man Aufschluss darüber, ob die Aktivierung der Caspase 9 nur eine Folge der Apoptose oder deren Ursache ist.

2.11.1 Testansatz und Proteingewinnung

2.11.1.1 Gewinnung des Zellproteins von HL 60-Zellen

9 ml einer Zellsuspension mit einer Konzentration von $0,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden in eine sterile Kulturflasche mit 40 ml Fassungsvermögen gegeben, mit 1 ml Testlösung versetzt und bei 37° C inkubiert. Zur Herstellung der Testlösung wurde eine 10 mM Stammlösung der Substanz in DMF mit PBS so verdünnt, dass die Endkonzentration im Ansatz dem jeweiligen IC₅₀-Wert für 24 h entsprach. Zu den einzelnen Messzeitpunkten wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 300·g abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 100 µl Lysis-Puffer resuspendiert, gevortext und für 15 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 800·g zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.^[153]

Lysis-Puffer:

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl,
1% Triton X-100,
2% Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem)
in Aqua bidest.
pH 7,4

2.11.1.2 Gewinnung des Zellproteins von adhärenenten Zellen

Bei der Durchführung mit den adhärenenten Zellen (518 A2 und Kb-V1) wurden je 10^5 Zellen in 1,5 ml Medium in die Wells einer sterilen 6-Well Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37° C. In die einzelnen Wells wurden in definierten zeitlichen Abständen jeweils 167 µl einer Testlösung gegeben, so dass die erste Zugabe der längsten Inkubationszeit entsprach. Die Herstellung der Testlösung erfolgte wie bei den HL 60-Zellen (siehe 2.11.1.1). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben gemeinsam geerntet. Die zum Zeitpunkt der Ernte mit $t = 0$ h unbehandelten Zellen dienten somit gleichzeitig auch als Negativkontrolle. Bei der Ernte wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 150 µl PBS gewaschen. Das PBS wurde dann dem Medium zugefügt. Mit 150 µl Trypsin-EDTA wurden die Zellen abgelöst, dann wurde dessen Aktivität durch das abgenommene Medium inhibiert. Die gesammelten Zellen wurden für 10 min bei 300·g abzentrifugiert, der nachfolgende Zellaufschluß erfolgte wie in 2.11.1.1 beschrieben.^[153]

2.11.1.3 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts in den einzelnen Proben fand mit der Bradford-Methode statt. Dazu wurden 50 µl einer 1:6,5 mit PBS verdünnten Probe mit 1,5 ml der Bradford-Fertiglösung versetzt und für genau 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine Referenz gemessen. Diesen Zweck erfüllte PBS mit dem wie beschrieben verfahren worden ist. Die Proteinkonzentration wurde dann anhand einer Eichgerade ermittelt. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen von Bovine Serum Albumin (BSA) in Lysis-Puffer/PBS (1:6,5) erstellt und mit der Bradford-Fertiglösung behandelt. Die

gemessene Absorption wurde gegen die bekannte Konzentration aufgetragen und es wurde eine Ausgleichsgerade erstellt. Die Eichgerade wurde für jede Charge der Fertiglösung neu erstellt. Ein Beispiel hierfür ist in Abb. 2.39 abgebildet.^[154, 155]

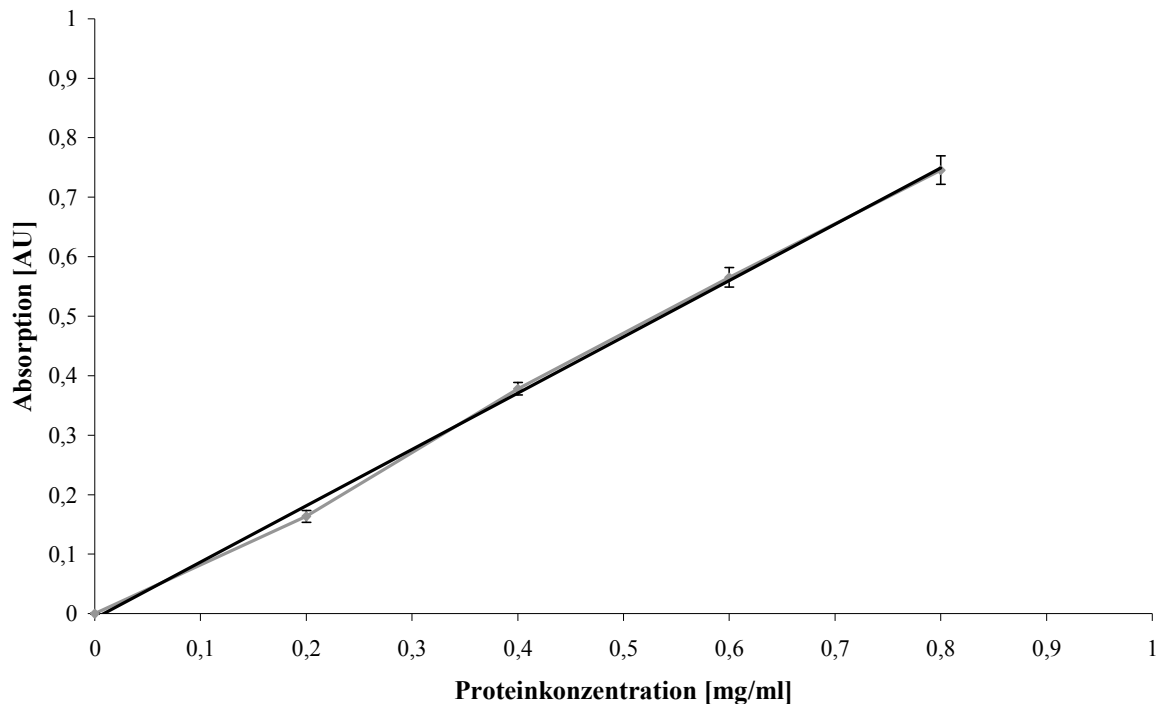


Abbildung 2.39: Eichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Verschieden stark konzentrierte Lösungen von BSA in Lysis-Puffer/PBS (1:6,5) wurden wie beschrieben analysiert. Anhand der für jede Konzentration festgestellten Absorption wurde eine Ausgleichsgerade gebildet. Deren Gleichung lautet $Abs_{595} = 0,8055c - 0,0081$ ($R^2 = 0,9987$) mit der Absorption Abs_{595} und der Proteinkonzentration c . Für den Erhalt der Messpunkte wurden die Ergebnisse von drei Messungen gemittelt.

2.11.2 Herstellung der PAGE-Gels

Die einzelnen Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) wurden als vertikale Plattenelektrophoresen im diskontinuierlichen System durchgeführt. Alle Trenngele waren 16 cm breit, 1 mm dick und 15 cm hoch. Die Sammelgele waren 0,5 cm hoch und mit 24 Geltaschen mit einem Volumen von jeweils 60 bis 100 µl versehen. Es wurden denaturierende 12%ige Trenngele mit 5%igem Sammelgel verwendet. Zur Bestimmung der am besten geeigneten Geldichte waren aber auch andere Mischungen ausprobiert worden (siehe Tab. 2.3).^[156]

Tabelle 2.3: Pipettierschema zur Gelherstellung

In der Tabelle sind die einzelnen Bestandteile sowie die davon benötigten Mengen für Gele unterschiedlicher Dichte angegeben. SDS wurde nur bei denaturierenden Gelen zugesetzt.

	Trenngel			Sammelgel	
	7,5%	12%	15%	5%	7,5%
Acrylamid/bis	9,0 ml	14,4 ml	18,0 ml	1,67 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	18,0 ml	18,0 ml	18,0 ml	-	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	5,0 ml	5,0 ml
H₂O bidest.	9,0 ml	3,6 ml	-	3,28 ml	2,45 ml
Na₂SO₃	50 mg	50 mg	50 mg	-	-
SDS (10%, w/v)	360,0 µl	360,0 µl	360,0 µl	100 µl	100 µl
TEMED	9,0 µl	9,0 µl	9,0 µl	5 µl	5 µl
APS (10%, w/v)	90,0 µl	90,0 µl	90,0 µl	50 µl	50 µl

Trenngelpuffer:

0,98 M Tris/HCl

in Aqua bidest.

pH 8,8

Sammelgelpuffer:

0,325 M Tris/HCl

in Aqua bidest.

pH 6,8

Zur Herstellung eines Gels wurden zuerst die beiden Glasplatten (20 auf 20 cm) mit aufgeklebten oder aufgelegten Spacern auf einem waagrecht ausgerichteten Gelgießstand mit Hilfe der Klemmen positioniert und fixiert. Die einzelnen Bestandteile des Trenngels bis auf SDS, APS und TEMED wurden zusammenpipettiert und das Gemisch 10 min im Ultraschallbad entgast. Danach wurden die restlichen Bestandteile unter vorsichtigem Rühren zugefügt und die fertige Gellösung wurde bis zu einer Höhe von 15 cm in den Freiraum zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet und 1 h zum Auspolymerisieren stehengelassen. Danach wurde das n-Butanol durch Spülen mit VE-Wasser entfernt. Das Sammelgel wurde auf die gleiche Weise wie das Trenngel hergestellt. Nach dem Einsetzen des Kamms

zwischen die Glasplatten wurde das Sammelgel mit Hilfe einer Pipette eingefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstanden. Anschließend wurde dem Gel ebenfalls 1 h Zeit zum Polymerisieren gelassen. Danach wurde der Kamm entfernt und die Geltaschen mehrfach mit VE-Wasser gespült. Die Entfernung des Wassers erfolgte dabei mit Hilfe von Druckluft. Nach dem letzten Spülgang wurde das Wasser in den Taschen gelassen und erst kurz vor der weiteren Verwendung entfernt.^[156]

2.11.3 Auftragen der Proben und Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden mit einer Proteinmenge von 70 µg Protein pro Tasche durchgeführt. Die Proteinprobe wurde dazu mit dem halben Probenvolumen Roti[®]-Load 1 versetzt und anschließend für 5 min bei 95° C im Thermomixer gekocht. Das Auftragen der Proben in die von Wasser und Gelresten befreiten Geltaschen erfolgte mit einer geeigneten Eppendorf-Pipette. Nach dem Übersichten der Proben mit Laufpuffer und dem Einsetzen des Gels in die Kammer wurde die Elektrophorese bei maximaler Spannung, maximaler Leistung und einer Stromstärke von 35 mA gestartet. Der Vorgang wurde beendet, wenn die Bromphenolblaulauffront ca. 10 cm weit gewandert war. Als Molekulargewichtsstandards wurden der Precision Plus Protein[™] Standard All Blue von Bio-Rad und der Roti[®]-Mark-BICOLOR von Roth verwendet.^[156]

Laufpuffer:

25 mM	Tris-HCl
112 mM	Glycin
0,1%	SDS
in VE-Wasser	
pH 8,3	

2.11.4 Färben der Gele

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus den Platten entfernt und entweder geblottet (siehe 2.11.5) oder gefärbt. Hierfür wurde das Gel in die Färbelösung gelegt. Die Färbung der Proteine erfolgte für 1 h auf einem Schüttler. Nach kurzem Spülen mit Aqua bidest. wurde das Gel zusammen mit Papier in die Entfärbelösung gebracht und unter Schütteln entfärbt bis keine blaue Hintergrundfarbe mehr zu sehen war (ca. 6 h). Das Papier diente hierbei zur teilweisen Regeneration der Entfärbelösung. Anschließend wurde das Gel mit einem Transilluminator photographiert.^[156]

Färbelösung:

500 mg	Coomassie Brilliant Blue R-250
454 ml	Methanol p.A.
100 ml	Eisessig
454 ml	Aqua bidest.

Entfärbelösung:

500 ml	Methanol p.A.
100 ml	Eisessig
1400 ml	Aqua bidest.

2.11.5 Western Blot

Um Proteine durch eine Immunoreaktion detektieren zu können, müssen diese zunächst von einem Polyacrylamidgel (siehe 2.11.2) auf eine Membran übertragen werden, was mittels Western Blot erreicht wurde. Dieser wurde elektrophoretisch als Tankblot durchgeführt. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran (Porengröße: $0,45\ \mu\text{m}$) zuerst für 15 min in Methanol, dann für 2 min in VE-Wasser und schließlich für 10 min in den Transferpuffer gelegt. Das Gel wurde 30 min im Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Transferkassette, wie in Abb. 2.40 dargestellt, zusammengebaut und in die mit 7 l Transferpuffer gefüllte Blottingkammer gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Matten und die Blotpapiere gut puffergetränkt waren und sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Die Übertragung fand in der wassergekühlten Kammer bei maximaler Spannung, maximaler Leistung und einer Stromstärke von 230 mA statt. Sie dauerte 75 min.^[157, 158]

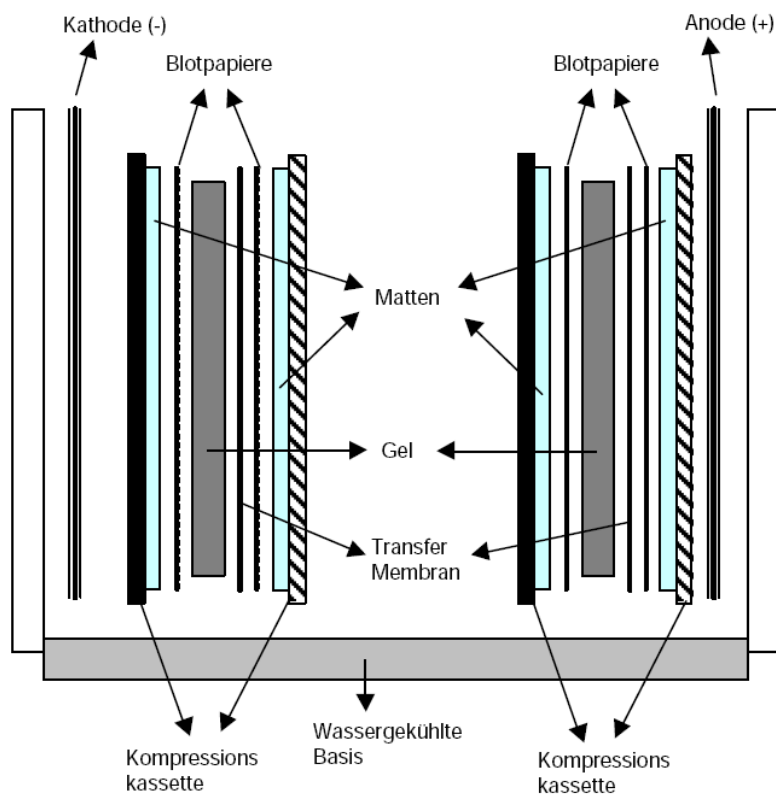


Abbildung 2.40: Aufbau des Western Blots

Polyacrylamidgel und PVDF-Membran wurden zwischen Blotpapieren und Matten aufeinandergelegt. Diese waren zuvor in Transferpuffer getränkt worden. Dann wurde dieser Stapel in die Kompressionskassette eingespannt und diese in den Blotting-Einsatz gegeben. Anschließend wurde für 75 min eine Stromstärke von 230 mA angelegt. Bild aus^[158]

Transferpuffer:

25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
20% Methanol
in VE-Wasser
pH 8,3

2.11.6 Färben der PVDF-Membranen

Nach dem Western Blot wurde die Membran entweder immunologisch untersucht (siehe 2.11.7) oder ähnlich wie das Gel gefärbt. Zum Färben wurde die PVDF-Membran für 2 min in PVDF-Färbelösung eingebracht, danach in der PVDF-Entfärbelösung unter Schütteln entfärbt bis kein Hintergrund mehr zu erkennen war (10-30 min). Anschließend wurde sie luftgetrocknet und photographiert. Auch hierfür wurde ein Transilluminator verwendet.^[159]

PVDF-Färbelösung:

1 g Coomassie Brilliant Blue R-250,
500 ml Methanol p.A.
70 ml Eisessig
460 ml Aqua bidest.

PVDF-Entfärbelösung:

500 ml Methanol p.A.
70 ml Eisessig
460 ml Aqua bidest.

2.11.7 Immunoreaktion gegen Caspase 9

Die spezifische Sichtbarmachung der Caspase 9 erfolgte durch eine immunologische Reaktion. Hierfür wurden nach dem Blot zuerst die freien Bindungsstellen blockiert, indem die PVDF-Membran für 75 min in 1% Milchpulver in AP-T gelegt wurde. Die Membran wurde dann drei mal 10 min mit AP-T gewaschen. Es folgten eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (1:1.000 in AP-T) und drei weitere Waschschrte. Dann wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert (1:10.000 bzw. 1:1.000 in AP-T) und es wurde erneut drei Mal gewaschen. Alle diese Schritte fanden statt, indem die Membran bei Raumtemperatur in einer Schale auf dem Schüttler mit der jeweiligen Lösung überschichtet wurde. Nach dem letzten Waschgang wurde das frisch zusammenpipettierte ECL-Substrat (bestehend aus Roti[®]-Lumin 1 und 2 im Verhältnis 1:1) für 3 min auf die Membran gegeben und wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran in eine Klarsichthülle verpackt und es wurde im Dunkeln für 10 bis 15 Minuten ein Röntgenfilm aufgelegt. Dieser wurde dann entwickelt und eingescannt, gespeichert wurde das Bild als pdf-Datei. Alternativ wurde zur Dokumentation auch ein Bio-Imaging-System verwendet, mit dem man direkt nach Zugabe des ECL-Substrats ein Bild der Membran aufnehmen konnte. Hierbei betrug die Belichtungszeit 1-5 min und das jeweilige Bild wurde nach der Bildbearbeitung mit dem zugehörigen Computerprogramm als 8-Bit- bzw. 16-Bit-tif-Datei gespeichert.^[160, 161]

AP-T:

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

0,25 mM MgCl₂

1% Tween 20

in VE-Wasser

pH 7,4

2.12 Der CAM-Assay

Substanzen mit cytotoxischer Wirkung haben daneben oft auch antiangiogene Eigenschaften, d.h. sie sind dazu in der Lage, die Neubildung von Blutgefäßen zu beeinträchtigen bzw. bereits bestehende zu schädigen. Dieser Fähigkeit kommt in der Krebstherapie eine besondere Bedeutung zu, da solide Tumoren davon abhängig sind, dass sie von einem mitwachsenden Kapillarnetz mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (siehe 1.1.3).^[162] Um feststellen zu können, ob von einer Substanz eine antiangiogene Wirkung ausgeht, wurde der CAM-Assay (chorioallantoic membrane-assay) durchgeführt. Dabei wird das Blutgefäßsystem eines befruchteten Hühnereis als Modell verwendet. Durch den Einfluss einer Testsubstanz auf dessen Ausbildung, kann man Rückschlüsse auf mögliche angiogenesehemmende Eigenschaften ziehen.^[163, 164]

2.12.1 Präparation der Eier und Aufzucht der Embryonen

Befruchtete Hühnereier, die von einem örtlichen Bauernhof bezogen wurden, wurden innerhalb von 24 h nach dem Ablegen in einen Brutschrank mit einer Temperatur 36 bis 38° C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% gegeben. Während der Aufzucht im Brutschrank wurden die Eier in Schräglage gehalten und von Zeit zu Zeit geschwenkt um ein Anwachsen des Embryos an der Eierschale zu vermeiden. Dabei wurde auch für einen ausreichenden Luftaustausch gesorgt. Um die Entwicklung des Embryos und der Blutgefäße dokumentieren zu können, wurde der Inhalt der Eier (Embryo, Eigelb und Eiweiß) in ein Gefäß überführt, in dem die weitere Entwicklung stattfand. Dazu wurden die Eier nach viertägigem Wachstum geöffnet und der Inhalt wie in Abb. 2.41 beschrieben in sterile, mit Folie bespannte Becher (siehe Abb. 2.42) gegeben. Diese wurden dann wieder in den Brutschrank zurückgestellt.^[165, 166]

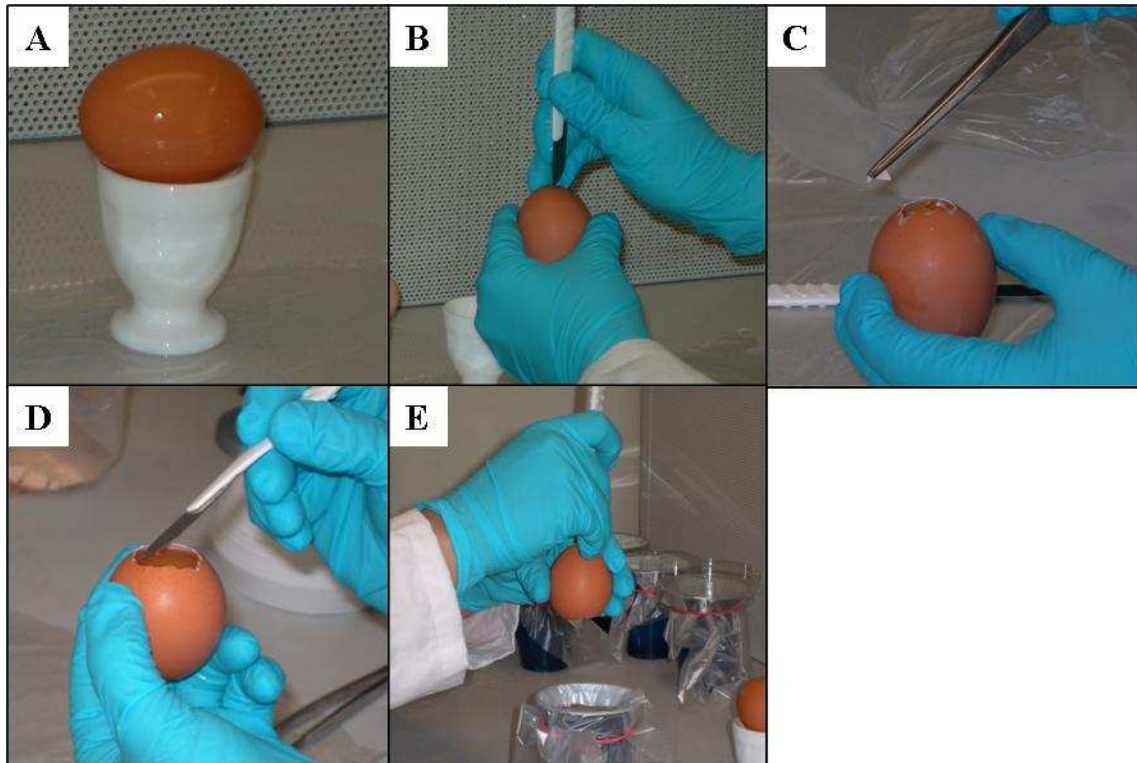


Abbildung 2.41: Überführung des Inhalts eines Eis in ein vorbereitetes Gefäß

Das Ei aus dem Brutschrank wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert und für 1-2 min auf die Seite gelegt, damit sich die Diskoblastula vom oberen Ende wegbewegt (A). Dann wurde die Schale am flachen Ende, wo sich die Luftkammer befindet, geöffnet (B). Die Öffnung wurde mit einer Pinzette vergrößert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine scharfen Kanten oder Spitzen entstehen (C). Die innere Membran wurde einschnitten (D), dann hielt man das Ei mit der Öffnung nahe über das Gefäß und ließ den Inhalt hineingleiten. Um dies zu erleichtern wurde an der gegenüberliegenden Seite der Schale eine weitere Öffnung hinzugefügt (E).^[165]

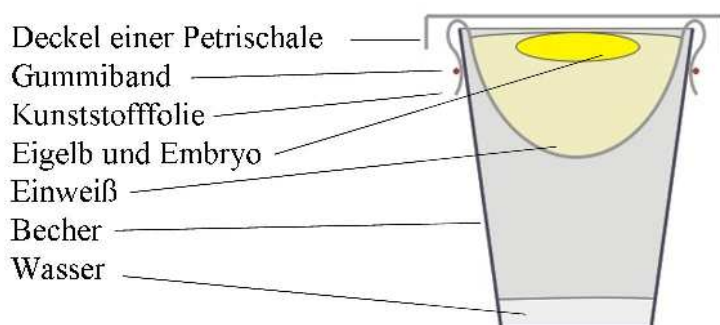


Abbildung 2.42: Aufbau des Bechers zur Zucht der Hühnerembryos

In einen Kunststoff-Kaffeebecher mit einem Fassungsvermögen von 200 ml wurden 30 ml steriles Wasser zum Beschweren gegeben. Anschließend wurde eine dünne Kunststofffolie mit einem Gummiband so fixiert, dass eine Vertiefung entsteht, die genug Raum für den Inhalt eines Eis lässt ohne dass dieser den Deckel berührt. Die Konstruktion wurde dann über Nacht UV-sterilisiert. Nach: ^[166]

2.12.2 Alternative Aufzuchtmethoden

Neben der in 2.12.1 beschriebenen Aufzucht in mit Folie bespannten Kaffeebechern wurden noch weitere Methoden getestet, um die Embryos außerhalb der Schale wachsen zu lassen. Bei all diesen Verfahren wurde immer nur das Gefäß variiert, die Entnahme des Eiinhalts (siehe Abb. 2.41) und die Inkubationsbedingungen blieben gleich.

2.12.2.1 Petrischalen

Der Inhalt eines Hühnereis wurde in eine sterile Petrischale aus Glas mit einem Durchmesser von 14 cm gegeben, die dann mit dem passenden Deckel verschlossen wurde. Da sich herausstellte, dass die Embryonen bei dieser Art der Aufzucht nur anfänglich wuchsen, wurden bei weiteren Untersuchungen Petrischalen benutzt, in deren Seitenrand vier Öffnungen mit einer Fläche von jeweils 0,25 cm² eingearbeitet waren.

2.12.2.2 Glasschalen

Des Weiteren wurde auch eine sterile Glasschale mit einem oberen Durchmesser von 7,5 cm, einem Bodendurchmesser von 3 cm und einer Höhe von 4 cm als Behältnis verwendet. Diese wurde mit dem Deckel einer Petrischale bedeckt. Bei einer Variante dieser Methode wurde die Glasschale in ein steriles Becherglas mit einem Fassungsvermögen von 1 l gestellt, das mit 100 ml VE-Wasser befüllt war. Die Öffnung des Becherglases wurde mit Aluminiumfolie verschlossen.^[167]

2.12.2.3 Plastikbecher

Bei einem weiteren Versuch diente ein UV-sterilisierter, verschließbarer Plastikbecher mit einem Durchmesser von 8 cm und einer Höhe von 4,5 cm als Gefäß. In diesem befand sich das Eiweiß eines weiteren Eis. Mit Hilfe einer heißen Kanüle waren seitlich unterhalb des Deckels vier Luftlöcher geschmolzen worden.

2.12.3 Test der Substanzen

Nach einem Wachstum der wie in 2.12.1 beschriebenen präparierten Embryos von weiteren 3 bis 5 d wurde der Test durchgeführt, indem die Testsubstanzen auf die entwickelten Äderchen gebracht wurden. Es wurden dabei mehrere Methoden der Substanzapplikation angewandt. Als Negativkontrolle diente PBS.

2.12.3.1 Applikation mit Silikonring

Auf eine Stelle mit gut sichtbaren Blutgefäßen wurde vorsichtig ein UV-sterilisierter Silikonring mit 10 mm Durchmesser und einer Dicke von 1,5 mm gesetzt. In die freie Fläche in der Mitte des Rings wurden 10 µl der Testlösung gegeben. Um diese herzustellen wurde eine 10 mM Stammlösung der jeweiligen Substanz in DMSO mit PBS auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt, so dass 10 nmol der Verbindung aufgetragen wurden. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37° C im Brutschrank.

2.12.3.2 Applikation über Plättchen

Ein UV-sterilisiertes Zellstoffplättchen mit 6 mm Durchmesser und einer Dicke von 0,5 mm wurde mit 100 µl der Testlösung getränkt und luftgetrocknet. Diese war wie unter 2.12.3.1 erstellt worden, so dass die aufgetragene Substanzmenge 100 nmol betrug. Dieses Plättchen wurde anschließend vorsichtig auf eine Stelle mit gut sichtbaren Blutgefäßen gesetzt. Auch hier verlief die Inkubation analog zu 2.12.3.1.

2.12.3.3 Direkte Applikation

Bei diesem Verfahren wurden 10 µl der Testlösung direkt auf die den Embryo umgebenden Blutgefäße gegeben. Die Lösung verteilte sich daraufhin auf der gesamten Fläche. Sie wurde wie unter 2.12.3.1 beschrieben hergestellt und auch die nachfolgenden Inkubationsbedingungen waren identisch.

2.12.4 Dokumentation

Um den Effekt auf die Blutgefäßbildung zu dokumentieren wurden Bilder des Embryos vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit der jeweiligen Substanz aufgenommen. Diese Bilder wurden mit einem Transilluminator zur Gelbetrachtung aufgenommen, wobei die Tür des Geräts offen blieb um eine ausreichende Belichtung zu gewährleisten. Das zugeschaltete Bildverarbeitungsprogramm lieferte dabei Bilder im TIF-Format. Die anschließende Auswertung erfolgte qualitativ anhand der Abbildungen.

3. Ergebnisse

3.1 Optimierung der Methode zur Gewinnung von Illudinen

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war, Methoden zur Untersuchung der biologischen Wirksamkeit von Naturstoffderivaten zu entwickeln. Deshalb war es von entscheidender Bedeutung, dass diese auch in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf Illudinderivate gelegt. Daher wurde versucht, ein Verfahren zu entwickeln, das eine ständige und zuverlässige Versorgung mit dem Ausgangsstoff Illudin M **11** sicherstellt. Dies sollte nicht auf synthetischem Weg erfolgen, sondern durch biotechnologische Prozesse.

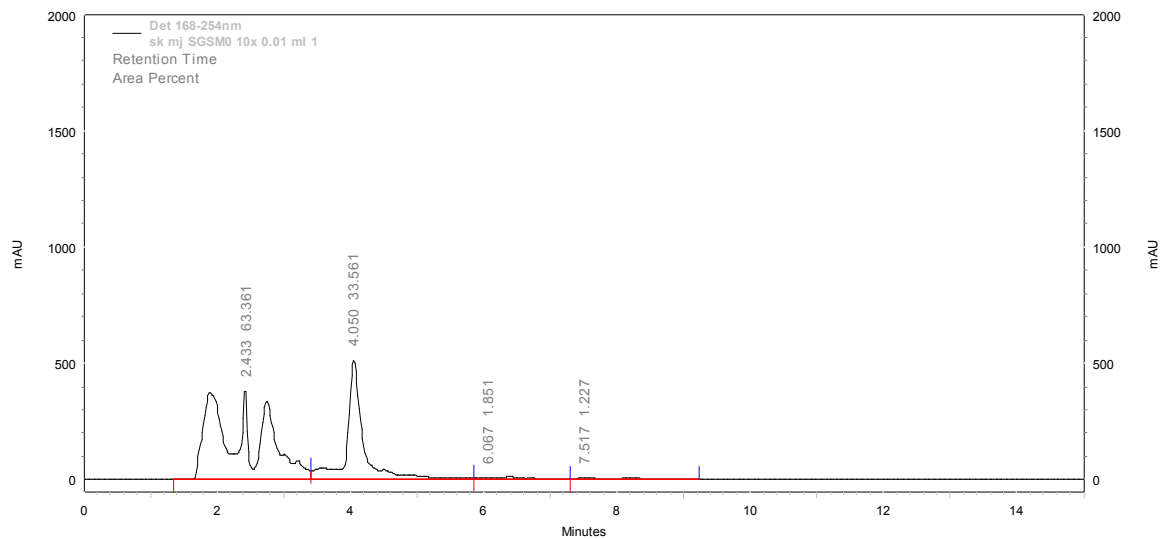
3.1.1 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen für die Illudin-Produktion

3.1.1.1 Illudin M

Als potentielle Illudinproduzenten wurden die beiden Basidiomyceten *Omphalotus olearius* und *Pleurotus japonicus* in Betracht gezogen. Die Pilze wurden wie unter 2.2.2 beschrieben in verschiedenen Nährmedien im kleinen Maßstab aufgezogen, das Medium extrahiert und die gewonnenen Rohextrakte per HPLC analysiert. Aus den per HPLC gewonnenen Daten wurde unter Berücksichtigung der Rohextraktmenge und der angesetzten Menge an Kulturmedium die theoretisch mögliche Ausbeute an Illudin M **11** pro Liter berechnet. Zur Berechnung der Konzentration im Rohextrakt anhand der Absorption wurde die Eichgerade aus Abb. 2.18 verwendet. In Abb. 3.1 sind beispielhaft die Chromatogramme zweier Rohextrakte im Vergleich gezeigt.

Ergebnisse

A



B

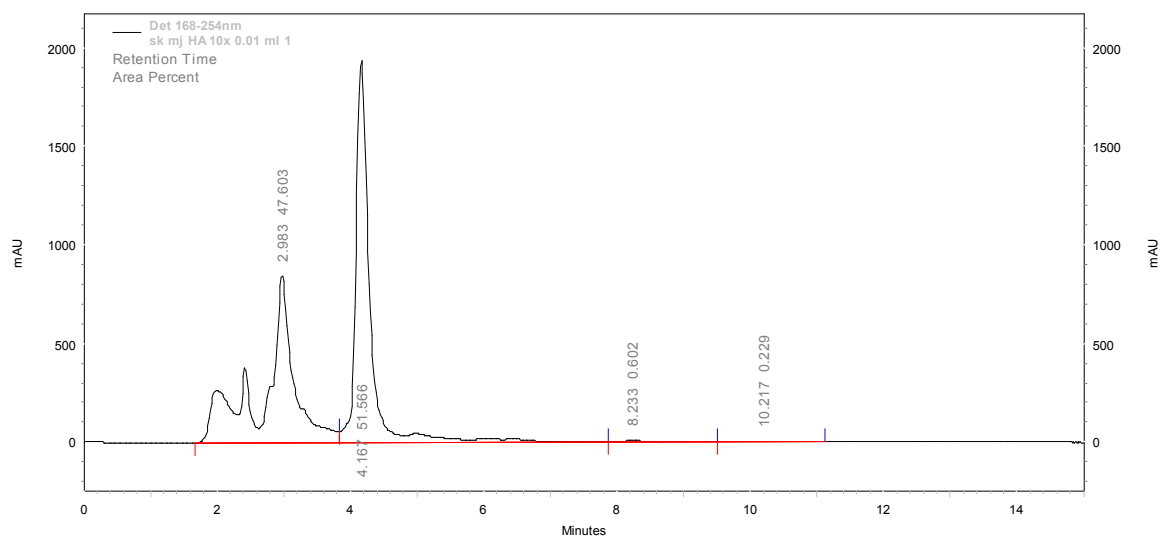


Abbildung 3.1: Vergleich zweier Chromatogramme des Rohextraktes

Es wurden jeweils 10 µl einer Lösung des Rohextraktes (5 mg/ml in H₂O/MeOH 1:1) per HPLC untersucht (siehe 2.2.1). Teilbild A zeigt ein Chromatogramm des Extrakts des SGSMØ-Mediums, Teilbild B eines des Extrakts des Medium HA-.

In Tab. 3.1 sind die bei diesen Untersuchungen ermittelten Daten aufgeführt. Abb. 3.2 zeigt einen graphischen Vergleich der Ergebnisse. Da bei den Medien HA+ und HA- nur bei zwei von drei Ansätzen ein Wachstum beobachtet werden konnte, wurden nur diese Kolben zur Untersuchung herangezogen.

Tabelle 3.1: Produktion von **11 bei Verwendung verschiedener Kulturmedien**

Für beide Pilzarten ist für jedes Nährmedium die bei der Extraktion gewonnene Menge an Rohextrakt, die per HPLC ermittelte Absorption und die aus beiden Werten errechnete Menge an **11** pro Liter Kulturmedium aufgelistet.

O. olearius

Medium	Rohextrakt [mg]	Absorption bei der HPLC [AU]		Gesamtmenge [mg/l]
		Mittelwert	Standardabweichung	
SGSMØ	588,7	454,8	10,1	51,7
HA-	124,3	1812,0	62,9	64,4
HA+	187,5	569,8	30,7	30,8
CDM	405,2	154,2	4,2	12,5
GCSL	208,9	1398,7	22,7	55,8
MSP	92,7	1479,9	24,5	26,2

P. japonicus

Medium	Rohextrakt [mg]	Absorption bei der HPLC [AU]		Gesamtmenge [mg/l]
		Mittelwert	Standardabweichung	
SGSMØ	123,0	156,9	7,2	3,8
HA-	43,3	710,7	236,7	5,9
HA+	125,2	2312,7	113,7	55,1
CDM	51,3	273,8	22,3	2,7
GCSL	72,3	77,0	5,7	1,2
MSP	88,6	1347,0	67,1	22,8

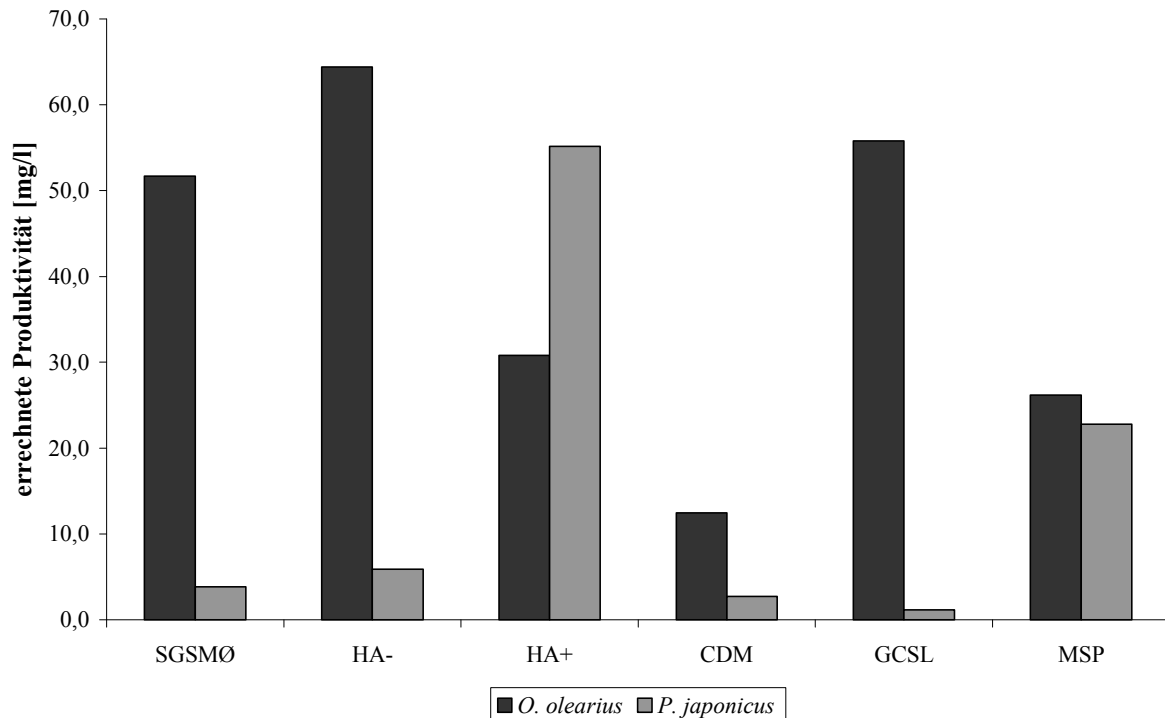


Abbildung 3.2: Produzierte Menge an **11 im Vergleich**

Das Balkendiagramm zeigt einen Vergleich aller getesteten Medien und Pilzarten hinsichtlich der Bildung von **11**. Als Maß dient hierbei die berechnete Menge an **11**, die aus 1 l des entsprechenden Mediums gewonnen werden könnte.

Man erkennt, dass der Pilz *Omphalotus olearius* im Medium HA- am meisten Illudin M **11** produziert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch getestet, ob es möglich wäre, den Gehalt an Illudin M **11** bzw. Illudin S **11a** direkt aus dem wässrigen Medium zu bestimmen. Dazu wurden Proben entnommen und filtriert, dann 1:1 mit Methanol gemischt und in die HPLC eingespritzt (siehe 2.2.1). In Abb. 3.3 ist ein Chromatogramm dieser Analyse dargestellt. Das Medium war hierbei SGSMØ. Es zeigte sich, dass der Hintergrund durch die Verunreinigungen im Medium noch zu stark ist, als dass man die gesuchten Peaks eindeutig identifizieren kann.

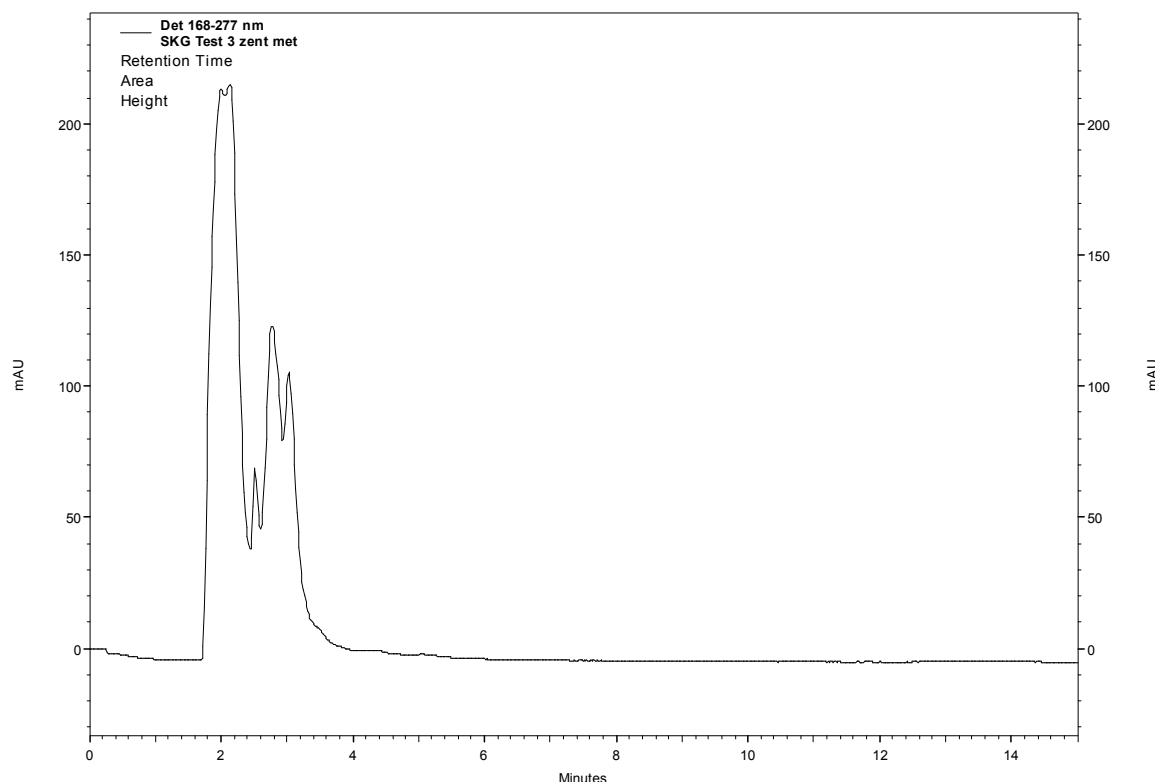


Abbildung 3.3: Chromatogramm der Analyse des wässrigen Mediums

10 µl einer Mischung des gereinigten Mediums SGSMØ mit Methanol (1:1) wurden per HPLC analysiert (siehe 2.2.1). Verglichen mit dem entsprechenden Rohextrakt ist die allgemeine Peakhöhe relativ gering (vgl. Abb. 3.1). In den Bereichen, in denen die charakteristischen Peaks von **11** bzw. **11a** zu finden sein müssten, sind noch weitere Peaks zu erkennen, so dass eine eindeutige Identifizierung nicht möglich ist (vgl. Abb. 2.17).

3.1.1.2 Illudin S

Auch wenn das Hauptanliegen darin bestand, die Produktion von **11** zu optimieren, wurde bei den beschriebenen Analysen ebenfalls überprüft, welche Auswirkungen die Wachstumsbedingungen auf die Bildung von Illudin S **11a** haben. Dies erfolgte analog zu der für Illudin M **11** beschriebenen Methode unter Verwendung der entsprechenden Eichgerade aus Abb. 2.18. In Tab. 3.2 sind die Resultate dieser Analysen aufgeführt, in Abb. 3.4 sind diese in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Auch hier wurde beachtet, dass von den beiden Medien HA+ und HA- nur 400 ml analysiert werden konnten.

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Produktion von **11a bei Verwendung verschiedener Kulturmedien**

Nach Pilzarten getrennt ist für jedes Kulturmedium die daraus gewonnene Menge an Rohextrakt, die gemessene Absorption von **11a** und die daraus berechnete Menge pro Liter Nährmedium aufgelistet.

O. olearius

Medium	Rohextrakt [mg]	Absorption bei der HPLC [AU]		Gesamtmenge [mg/l]
		Mittelwert	Standardabweichung	
SGSMØ	588,7	85,1	0,7	12,0
HA-	124,3	990,9	26,7	46,4
HA+	187,5	566,6	16,0	39,9
CDM	405,2	76,3	2,5	7,4
GCSL	208,9	211,2	2,4	10,9
MSP	92,7	213,8	5,1	4,9

P. japonicus

Medium	Rohextrakt [mg]	Absorption bei der HPLC [AU]		Gesamtmenge [mg/l]
		Mittelwert	Standardabweichung	
SGSMØ	123,0	788,9	53,3	24,4
HA-	43,3	437,0	144,7	4,7
HA+	125,2	308,6	27,5	9,6
CDM	51,3	470,3	36,9	6,0
GCSL	72,3	508,9	89,1	9,2
MSP	88,6	543,0	23,8	12,1

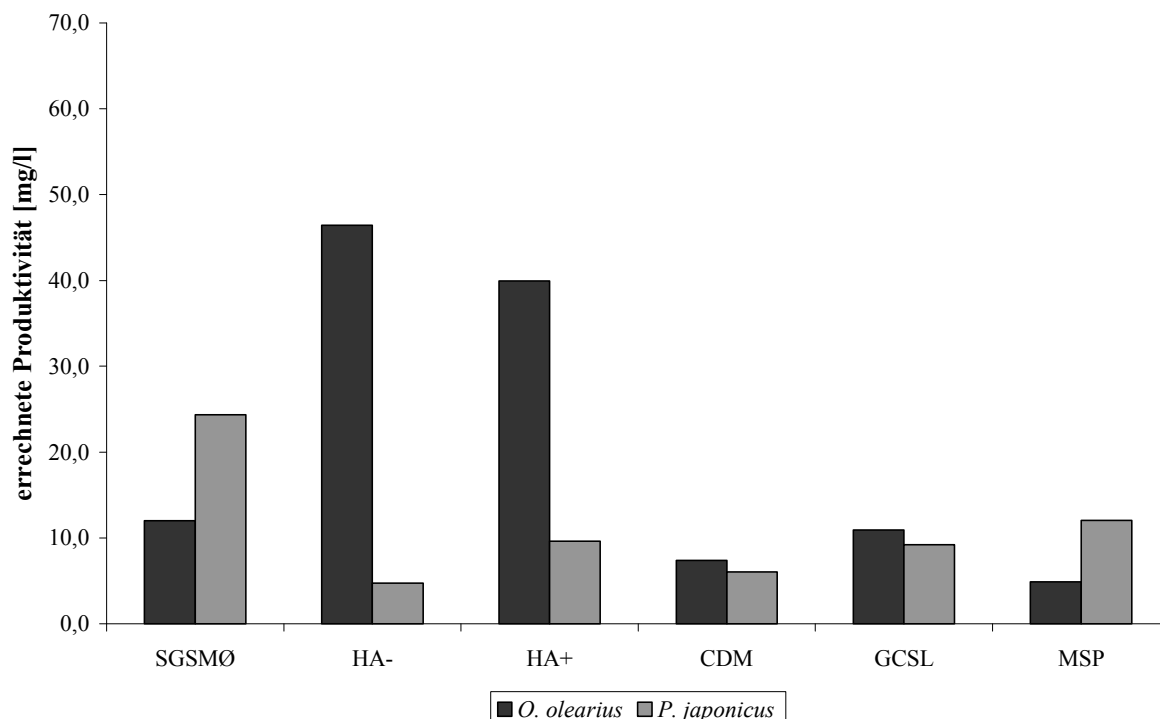


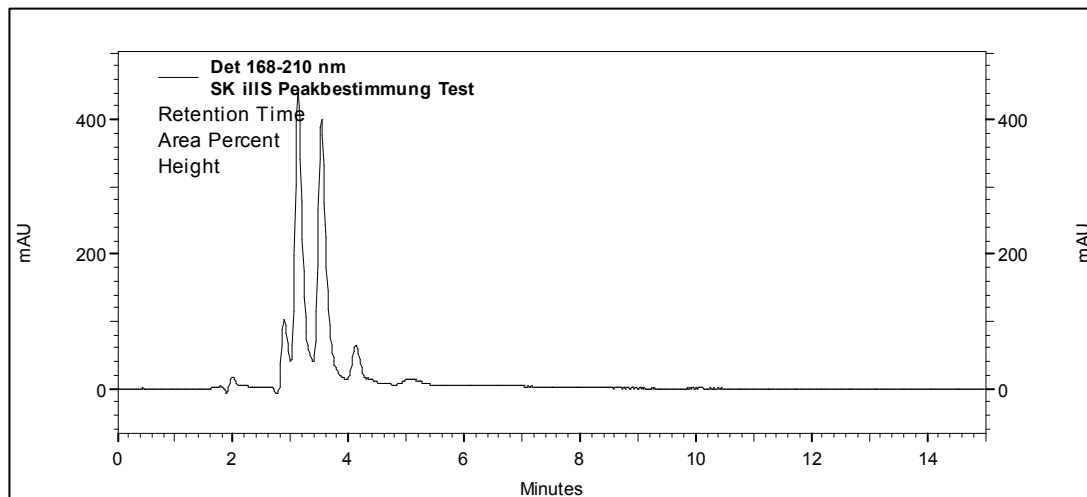
Abbildung 3.4: Produzierte Menge an **11a im Vergleich**

Die Abbildung zeigt einen Vergleich der berechneten Menge an **11a** pro 1 l Medium für die getesteten Medien und Pilzarten.

Der Pilz *Omphalotus olearius* bildet im Medium HA- auch am meisten **11a**. Die Menge ist jedoch geringer als die von **11**.

Bei der Analyse der Lösung des Rohextrakts in Methanol/Wasser (1:1) zeigte sich nach einer vierstündigen Inkubation bei Raumtemperatur ein weiterer Peak. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um ein Abbauprodukt handelt (siehe Abb. 3.5). Deshalb wurden immer nur frisch hergestellte Lösungen untersucht und das Methanol wurde erst kurz vor der Analyse zur wässrigen Lösung von **11**, **11a** (1 mg/ml) oder des Rohextraktes (10 mg/ml) gegeben.

A



B

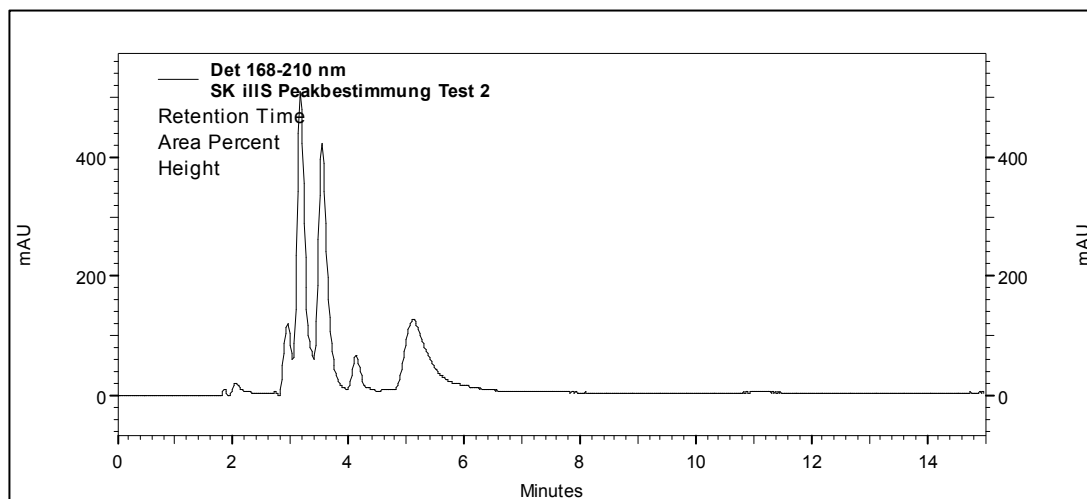


Abbildung 3.5: Vergleich zweier Chromatogramme des Rohextraktes

Es wurden jeweils 10 µl einer Lösung des Rohextraktes (5 mg/ml in H₂O/MeOH 1:1) untersucht (siehe 2.2.1). Teilbild A zeigt ein Chromatogramm des Rohextrakts, das unmittelbar nach dem Lösen erstellt wurde. In Teilbild B sieht man ein Chromatogramm derselben Stammlösung, die 4 h später erneut untersucht wurde.

3.1.2 Ermittlung der optimalen Extraktionsmethode für Illudine

Nachdem ermittelt worden war, welche Aufzuchtmethode für die Gewinnung von Illudin M **11** am Besten geeignet ist (siehe 3.1.1), wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung der Substanz aus dem Kulturmedium getestet. Hierbei spielten neben dem Ziel, möglichst viel des enthaltenen **11** zu extrahieren noch weitere Aspekte eine Rolle. So sollte das Verfahren auch möglichst zeitsparend, wenig kostenintensiv und ohne größeren Aufwand zu bewältigen sein. Außerdem sollte es im größeren Maßstab realisierbar sein, da zur Gewinnung einer möglichst großen Menge an Substanz, die Aufzucht in einen 20 l-Fermenter verlagert wurde (siehe Abb. 2.24). Die Quantifizierung erfolgte analog zur Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen per HPLC (siehe 2.2.1). Da die Aufzuchtbedingungen immer gleich waren, sollte auch die Menge an Illudinen im Medium immer gleich sein. Die laut Berechnung im Rohextrakt enthaltene Menge an **11** bzw. **11a** spiegelt in diesem Fall also die Effektivität der Extraktionsmethode wider.

3.1.2.1 Ausschütteln

Die Extraktion im Scheidetrichter war die erste Methode, die eine gewisse Menge an **11** und **11a** lieferte und alle anderen wurden an ihr gemessen. Neben Essigsäureethylester wurde als Lösungsmittel Chloroform getestet (siehe 2.2.3.1). In Tab. 3.3 ist die berechnete Effektivität der jeweiligen Extraktionsmethode verglichen, in Abb. 3.6 ist das Ergebnis graphisch dargestellt und in Abb. 3.7 sind die zugehörigen Chromatogramme aufgeführt. Da die Optimierung der Extraktionsmethode parallel zur Optimierung der Wachstumsbedingungen erfolgte, wurde in diesem Fall noch das Nährmedium SGSMØ verwendet. Es wurden jeweils 500 ml des Mediums extrahiert.

Ergebnisse

Tabelle 3.3: Effektivität der Extraktion von Illudinen bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel

Es ist die bei der Extraktion mit Essigsäureethylester bzw. Chloroform gewonnene Menge an Rohextrakt sowie die bei der HPLC-Analyse dieses Extrakts ermittelte Absorption von **11** und **11a** aufgelistet. Aus diesen beiden Werten wurde die Menge an **11** bzw. **11a** pro Liter Kulturmedium berechnet.

11

Lösungsmittel	Rohextrakt [mg]	Absorption	Gesamtmenge [mg/l]
Essigsäureethylester	84,7	2414,8	46,8
Chloroform	107,7	1097,1	27,1

11a

Lösungsmittel	Rohextrakt [mg]	Absorption	Gesamtmenge [mg/l]
Essigsäureethylester	84,7	421,2	21,8
Chloroform	107,7	44,2	3,2

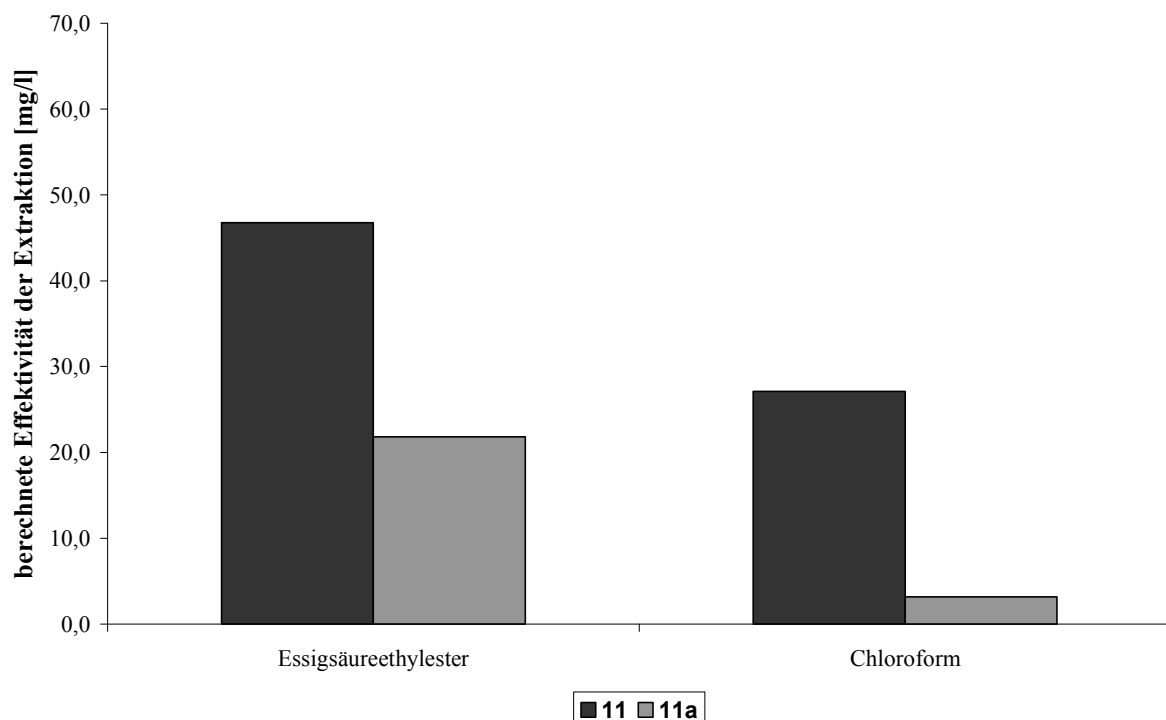


Abbildung 3.6: Extrahierte Menge an Illudinen im Vergleich

Das Balkendiagramm zeigt die berechneten Mengen an **11** und **11a**, die mit den getesteten Lösungsmitteln aus einem 1 l Medium gewonnen werden können.

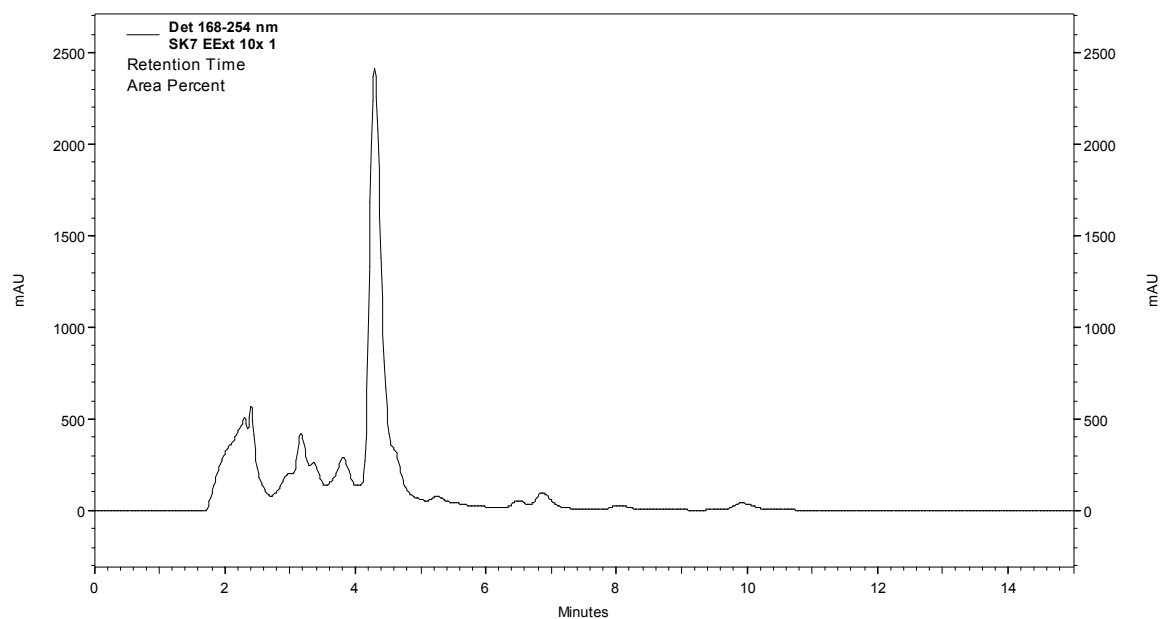
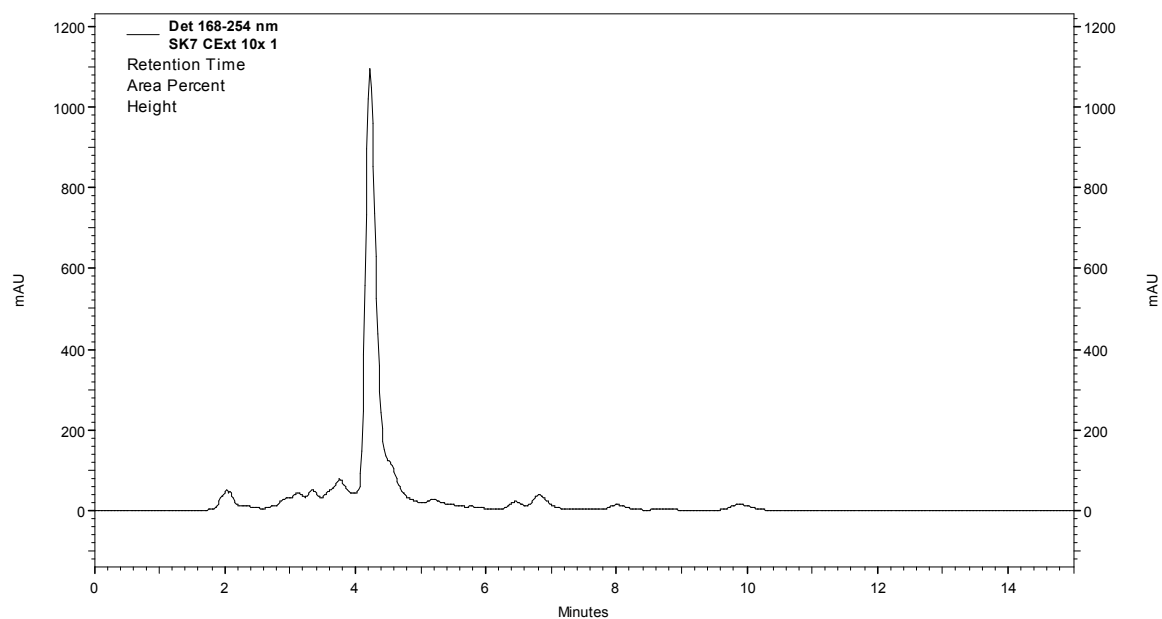
A**B**

Abbildung 3.7: Vergleich der Chromatogramme

Es wurden 10 μl einer Lösung des jeweiligen Rohextraktes (5 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1) analysiert (siehe 2.2.1). Teilbild A zeigt ein Chromatogramm des durch die Extraktion mit Essigsäureethylester gewonnen Rohextrakts, Teilbild B das entsprechende Chromatogramm des Chloroformextrakts.

Bei der Extraktion mit Chloroform gewinnt man weniger **11** als bei der mit Essigsäureethylester. **11a** kann man so nahezu gar nicht isolieren.

3.1.2.2 Extraktion nach Kutscher-Steudel

Durch Ausschütteln mit Essigsäureethylester erhält man zwar eine zufriedenstellende Menge an **11**, allerdings wurde untersucht, ob man genügend **11** auch durch eine Extraktion nach Kutscher-Steudel gewinnen kann (siehe 2.2.3.2). Zwischenzeitlich hatte der verwendete Pilzstamm das Wachstum eingestellt und es musste ein neuer Stamm angeschafft werden, weshalb die oben genannten Referenzdaten aus der HPLC-Analyse nicht genutzt werden konnten. Da zum Zeitpunkt dieser Untersuchung auch die HPLC nicht mehr zur Verfügung stand, wurde der Vergleich auf anderem Wege vorgenommen. Es wurden zwei 18 l-Ansätze komplett extrahiert, einmal durch Ausschütteln mit Essigsäureethylester und einmal mit Hilfe des Kutscher-Steudel-Extraktors. Als Lösungsmittel wurde hierbei Diethylether verwendet, da bei vorhergehenden Untersuchungen festgestellt wurde, dass **11** in der Siedehitze von Essigsäureethylester nicht stabil ist. Es wurden die jeweiligen Gesamtgewichte, des nach der säulenchromatographischen Auftrennung gewonnenen **11** bestimmt und miteinander verglichen. Bei der herkömmlichen Extraktion konnten 556 mg, bei der nach Kutscher-Steudel 402 mg **11** gewonnen werden. Dies entspricht 72,3% der durch Ausschütteln gewonnenen Menge. Um festzustellen, ob durch längeres Extrahieren die Ausbeute noch gesteigert werden kann, wurde Pilzmedium, das bereits einmal extrahiert worden war, nochmals auf die gleiche Weise extrahiert. Für diese Untersuchung stand auch wieder die HPLC zur Verfügung. Es wurde die Menge an **11** berechnet, die nach einmaliger Extraktion zur Verfügung stehen würde, dann wurde das Medium erneut extrahiert und analysiert. Die Mengen an **11**, die bei beiden Durchläufen ermittelt werden konnten, wurden summiert und dieses Gewicht gleich 100% gesetzt. Dann wurden die Anteile der jeweiligen Teilmengen an der Gesamtmenge berechnet (siehe Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Gewonnene Menge an 11 in Abhängigkeit von der Extraktionsdauer

Für beide Extraktionsdurchgänge ist die dabei gewonnene Menge an Rohextrakt, die bei der HPLC-Analyse festgestellte Absorption von **11** und die daraus berechnete Menge pro Liter angegeben. Daneben ist zu sehen welchen Anteil diese Teilmengen an der Gesamtmenge ausmachen.

	Rohextrakt [mg]	Absorption	Menge an 11 [mg/l]	% der Gesamtmenge
1. Extraktion	347,3	1488,7	23,7	91,8
2. Extraktion	257,1	172,0	2,1	8,2

Da man die bei der zweiten Extraktion gewonnene Menge an **11** vernachlässigen kann, wurde das Medium im Folgenden immer nur einmal für 5,5 h extrahiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch ermittelt, wie viel von dem ins Medium abgegebenen **11** nach der Aufreinigung tatsächlich noch vorhanden ist (siehe Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Ausbeute an **11 nach der Aufreinigung**

Angegeben sind die aus 18 l Medium gewonnene und die auf die Säule aufgetragene Menge an Rohextrakt (extrahierte und aufgereinigte Menge). Ebenfalls aufgeführt ist die Menge an **11**, die jeweils darin enthalten sein müssten (Gehalt an **11**) sowie die Menge, die nach der Aufreinigung tatsächlich erhalten wurde (Gewonnene Menge). Die theoretisch mögliche Menge ergibt sich aus der berechneten Gesamtmenge an **11** pro Liter nach zweimaliger Extraktion hochgerechnet auf 18 l (vgl. Tab. 3.4). Für alle Illudinmengen wurde bestimmt, welchem Anteil an der theoretisch möglichen Menge dies entspricht.

	Rohextrakt [g]	Gehalt an 11 [mg]	Teil der theoretischen Menge [%]
Theoretisch mögliche Menge (hochgerechnet)		464	100
Extrahierte Menge (berechnet)	2,07	458,8	98,9
Aufgereinigte Menge (berechnet)	1,91	423,3	91,2
Gewonnene Menge (gewogen)		401,9	86,6

Es wurde später festgestellt, dass das nach der säulenchromatographischen Auftrennung erhaltene **11** immer noch Verunreinigungen von bis zu 40% aufwies, die jedoch per HPLC nicht feststellbar waren. Um was es sich dabei handelt, konnte nicht genau festgestellt werden. Da aber alle Untersuchungen mit dem gleichen verunreinigten **11** durchgeführt wurden, können die angegebenen Werte dennoch als verlässlich eingestuft werden.

3.1.3 Gewinnung von Illudinen unter Verwendung von XAD16

Weitere Tests beschäftigten sich mit der Frage, ob es möglich wäre, **11** durch Adsorption aus dem Medium zu gewinnen. Hierbei fand das Harz XAD16 Verwendung. Einmal erfolgte dessen Zugabe zum Kulturmedium nach einer Wachstumsphase von zehn Tagen und dessen Extraktion mit Essigsäureethylester. Bei einem weiteren Versuch wurde es bereits zu Beginn dem Nährmedium zugegeben und die Extraktion wurde mit Aceton vorgenommen (siehe 2.2.3.3). Das vom XAD16 abgetrennte Medium wurde nach Kutscher-Steudel extrahiert, die Quantifizierung wurde per HPLC vorgenommen (siehe 2.2.1 und 2.2.3.2). Es wurden jeweils 900 ml des Mediums HA- untersucht. Als Referenzmethode diente die Extraktion nach Kutscher-Steudel mit Diethylether (siehe 3.1.2.2). In Tab. 3.6 sind die ermittelten Resultate aufgeführt, in Abb. 3.8 sind diese graphisch dargestellt.

Tabelle 3.6: Effektivität der Gewinnung von **11 unter Verwendung von XAD16**

Für die verglichenen Methoden sowie für den Kontrollansatz sind die bei der Extraktion des Mediums und des Harzes gewonnene Menge an Rohextrakt, die bei der HPLC-Analyse gemessene Absorption und die daraus errechnete Menge an **11** pro Liter aufgelistet.

Zugabe nach 10 d Wachstum, Extraktion mit Essigsäureethylester

	Rohextrakt [mg]	Absorption	Gesamtmenge [mg/l]
Extrakt von XAD16	178,1	262,9	6,1
Extrakt des Mediums	60,6	86,4	0,7
Summe			6,8

Zugabe direkt, Extraktion mit Aceton

	Rohextrakt [mg]	Absorption	Gesamtmenge [mg/l]
Extrakt von XAD16	333,0	281,6	12,2
Extrakt des Mediums	54,3	2644,2	36,4
Summe			48,6

Kontrolle

	Rohextrakt [mg]	Absorption	Gesamtmenge [mg/l]
gesamt	97,9	2473,1	61,5

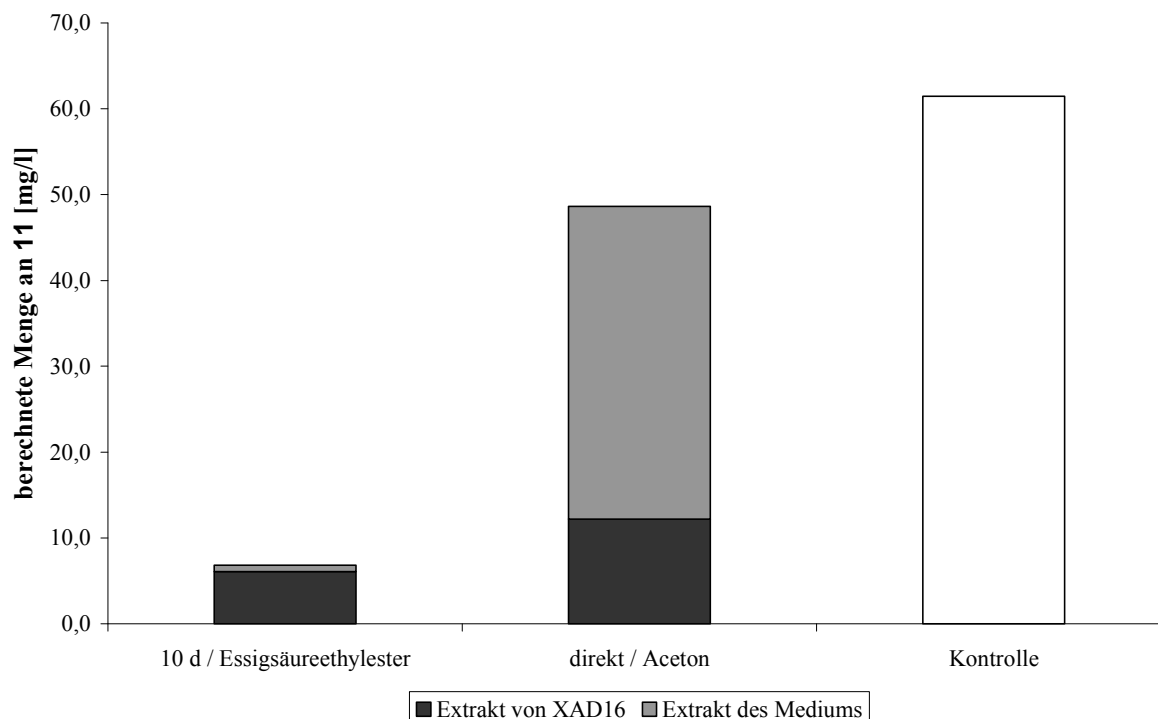


Abbildung 3.8: Gewinnung von **11 unter Verwendung von XAD16**

Zu sehen ist die berechnete Menge an **11**, die aus einem Ansatz mit XAD16 von 1 l gewonnen werden könnte, sowie zum Vergleich die des Kontrollansatzes. Die Balken der Ansätze mit XAD16 geben nicht nur die Gesamtmenge an **11** wieder, sondern zeigen auch, wie viel davon bei der Extraktion des XAD16 und bei der Extraktion des Mediums anfiel.

Bei beiden Varianten kann **11** nur in geringerem Maß als bei der herkömmlichen Methode erhalten werden. Auf eine Untersuchung der Gewinnung von **11a** wurde verzichtet.

3.2 Stabilitätsuntersuchungen an Estern

3.2.1 Tests an Platinkomplexkonjugaten per HPLC

Um festzustellen, ob es bei Platinkomplexkonjugaten zu einer Spaltung der Esterbindung in wässriger Umgebung kommt, wurden Lösungen der entsprechenden Verbindungen bei 37° C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und ihre Zusammensetzung per HPLC analysiert (siehe 2.4.1). Als Modellsubstanzen dienten hierbei die Derivate **13a**, **16c** und **18**. **13a** ist ein Menthol- und **16c** ein Estradiolkonjugat. **18** leitet sich von Tamoxifen **6** ab. Abb. 3.9 zeigt den Anteil an **13a** in wässriger Lösung, wobei die zu Beginn der Inkubationszeit festgestellte Absorption 100% entspricht. Abb. 3.10 gibt den Anteil an Estradiol **5b** in einer Lösung von **16c** wieder. **5b** würde bei der Hydrolyse von **16c** entstehen, ein Auftreten also eine Esterspaltung implizieren. Der Gehalt an **5b**, der bei einem vollständigen Abbau von **16c** entstehen würde, wurde gleich 100% gesetzt. In Abb. 3.11 ist der Anteil an **18** in Lösung zu sehen. Auch hier entsprechen 100% dem Anfangsgehalt.

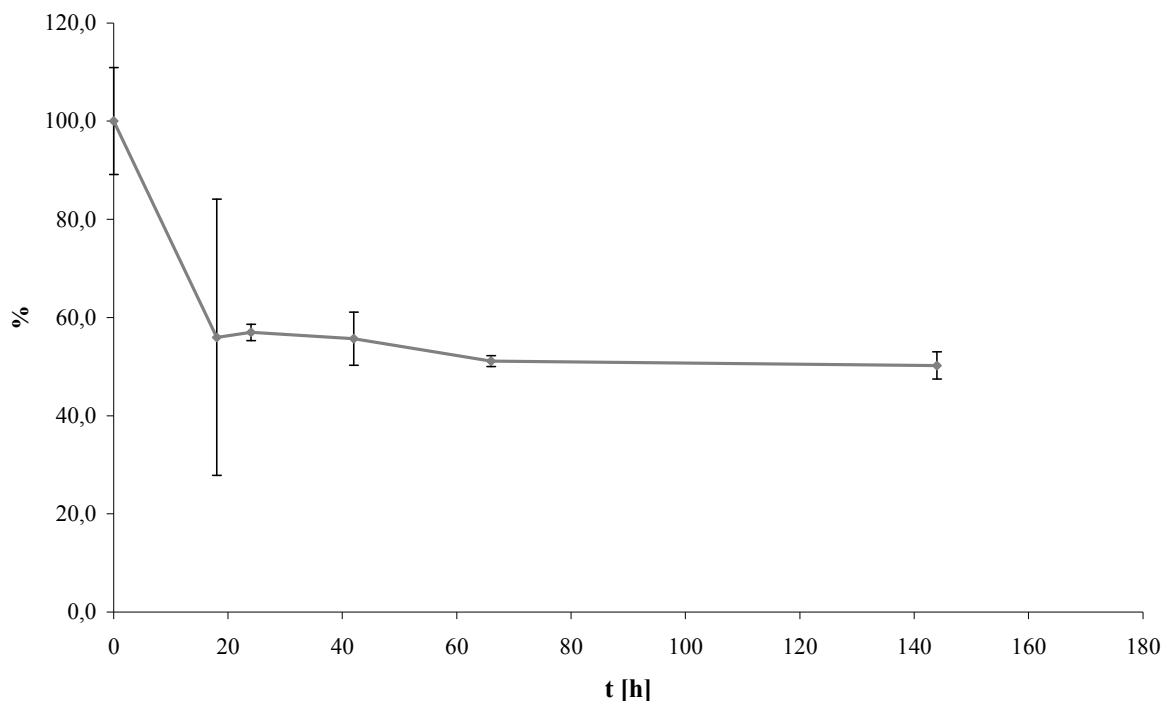


Abbildung 3.9: Hydrolyse von 13a

Im Diagramm ist der relative Gehalt an **13a** in der untersuchten Lösung zu verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt. Die zugehörige Standardabweichung der einzelnen Messwerte ist mit angegeben.

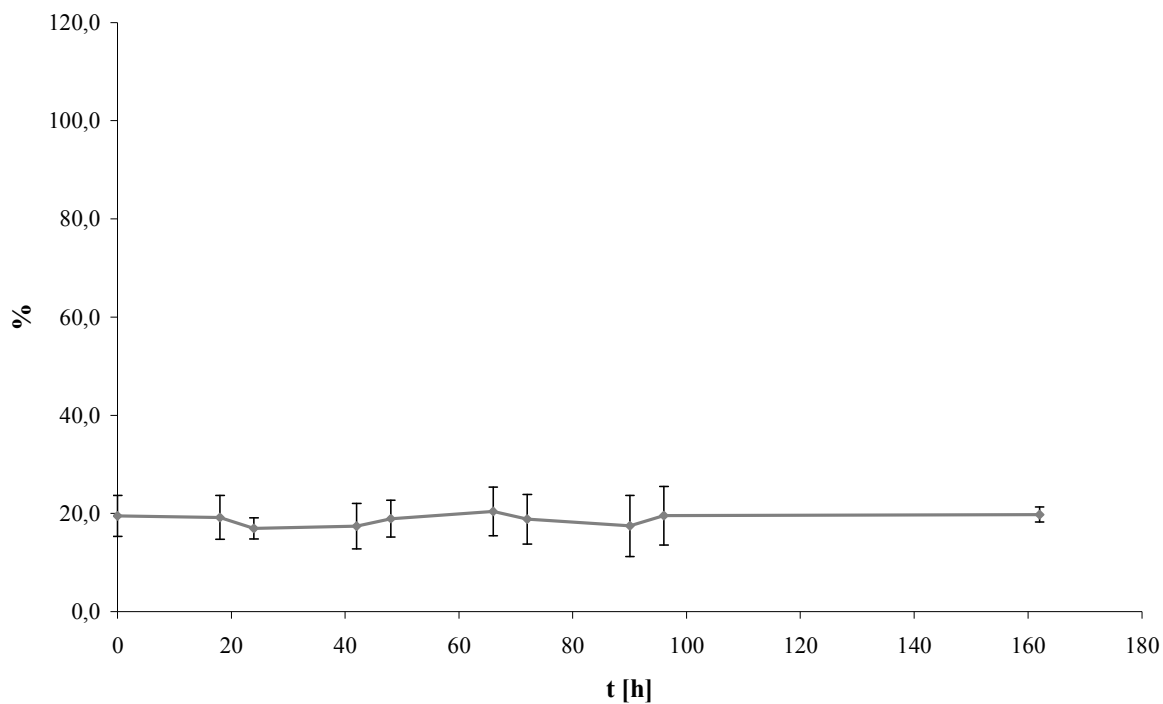


Abbildung 3.10: Hydrolyse von 16c

Das Diagramm zeigt die relative Menge von **5b** im Ansatz im zeitlichen Verlauf mit Standardabweichung.

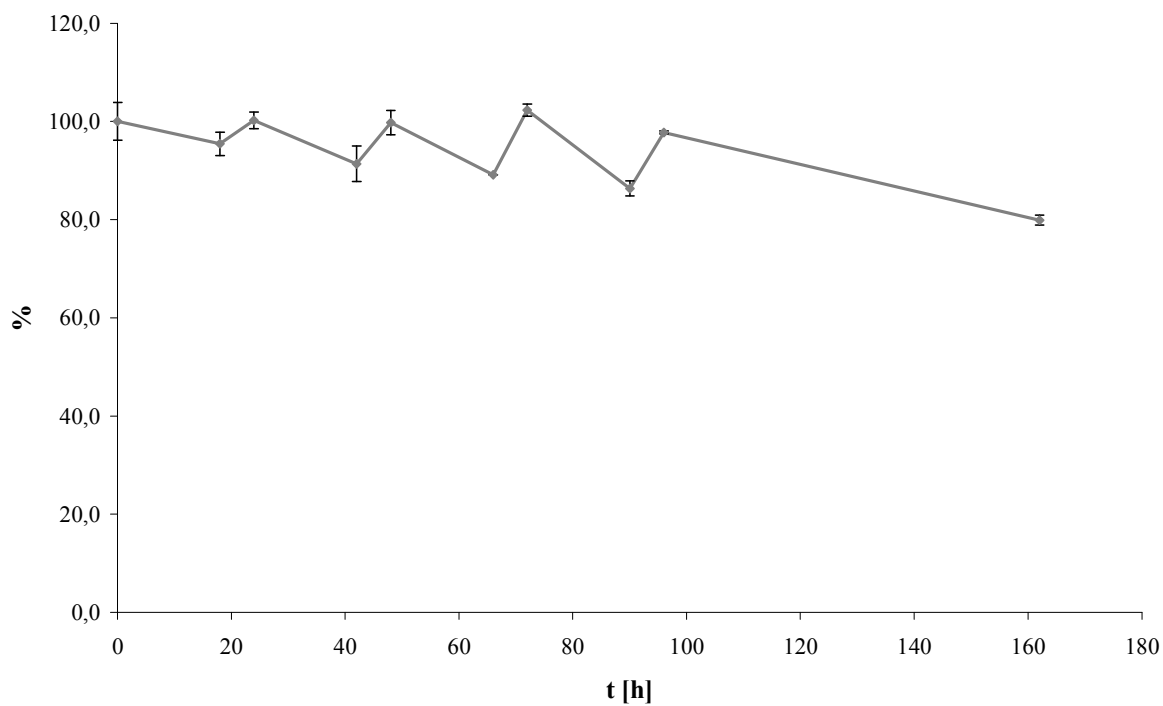


Abbildung 3.11: Hydrolyse von 18

Dargestellt ist der Gehalt an **18** in Lösung mit der zugehörigen Standardabweichung.

3.2.2 Tests an Rutheniumkomplexen via Absorptionsmessung

Bei der Untersuchung der steroidhaltigen Rutheniumarene **19a** und **19b** wurden wässrige Lösungen bei 37° C inkubiert und spektroskopisch untersucht (siehe 2.4.2). Da die potentiellen Hydrolyseprodukte eine geringere Absorption aufweisen, müsste diese im Falle einer Bindungsspaltung abnehmen. In Abb. 3.12 und Abb. 3.13 sind die Absorptionsspektren wässriger Lösungen von **19a** und **19b** zu verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt. Da sich bei den Verbindungen kein klares Absorptionsmaximum herauskristallisiert hat, wurden Spektren im Bereich von 350 bis 600 nm untersucht. Sie wurden 0 h, 3 h, 6 h, 1 d, 2 d, 3 d und 7 d nach Beginn der Inkubation aufgenommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind allerdings immer nur die Resultate von jeweils vier Messungen angegeben.

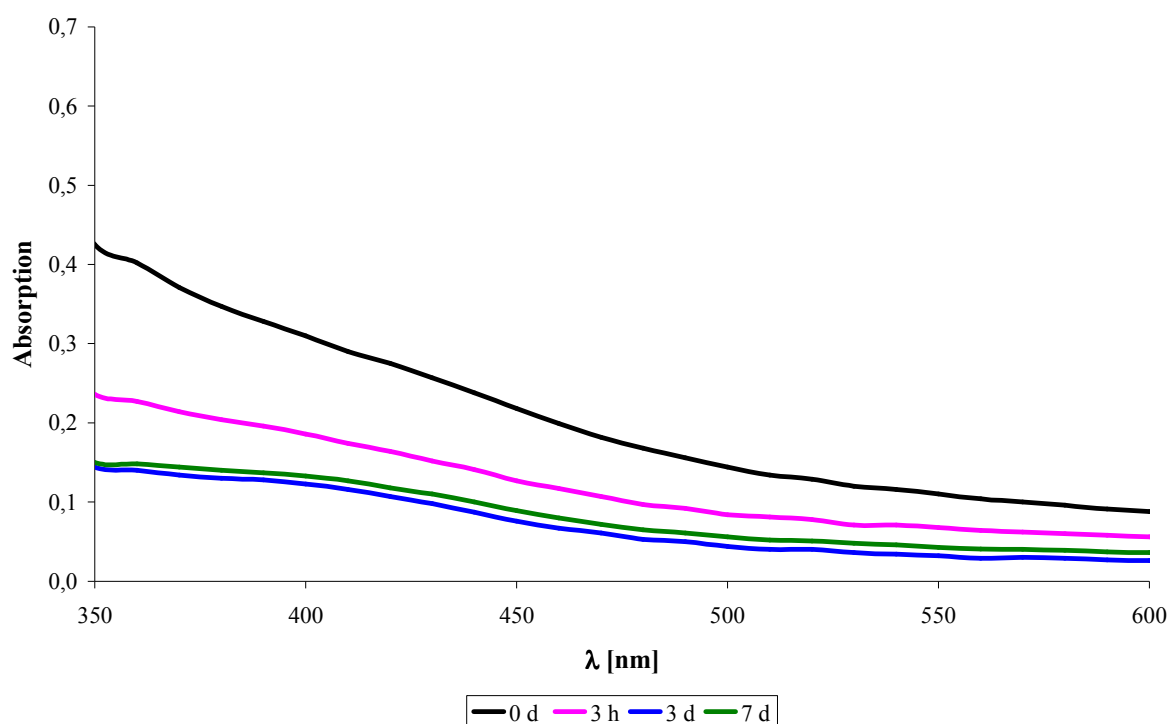


Abbildung 3.12: Absorptionsspektren einer wässriger Lösung von **19a im zeitlichen Verlauf**

Zu sehen ist die Absorption einer Lösung von **19a** (0,2 mM in PBS (pH 7,4) mit $\leq 2\%$ DMSO) bei der jeweiligen Wellenlänge (350 bis 600 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 7 d nach Beginn der Inkubation).

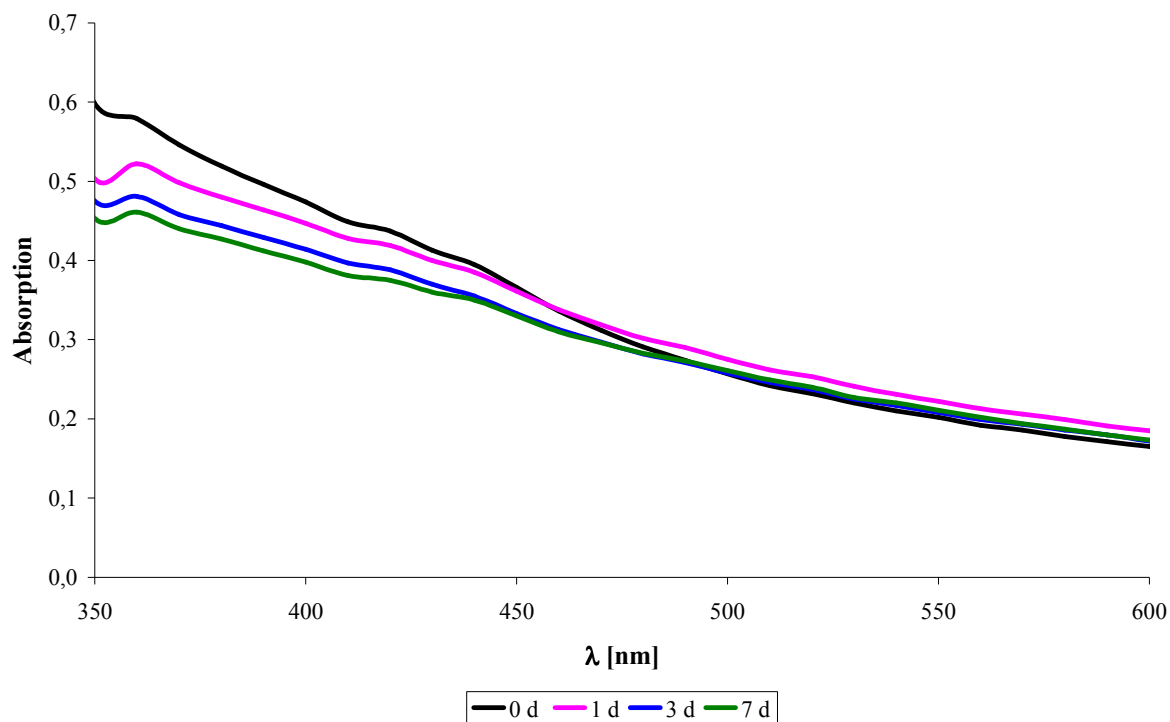


Abbildung 3.13: Absorptionsspektren einer wässriger Lösung von **19b im zeitlichen Verlauf**

Das Diagramm zeigt die Absorption einer Lösung von **19b** (0,2 mM in PBS (pH 7,4) mit $\leq 2\%$ DMSO) bei der jeweiligen Wellenlänge (350 bis 600 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 7 d nach Beginn der Inkubation).

Bei **19b** kann man kaum eine Absorptionsänderung feststellen, bei **19a** kommt es zu einer Abnahme, die auf eine mögliche Hydrolyse hindeutet.

3.3 Bestimmung von Komplexbildungskonstanten

Viele Metallkomplexe besitzen bioaktive Eigenschaften, die stark von den jeweiligen Liganden abhängen. Da diese in der Gegenwart anderer Liganden ausgetauscht werden können, wurden einige Verbindungen hinsichtlich ihrer Neigung zur Komplexbildung untersucht. Dies wurde wie unter 2.5 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde anhand der Absorption farbiger Metallkomplexe ihre Konzentration $[M(L)_n]$ in einem Ansatz mit EDTA bestimmt. Aus diesem Wert, den eingesetzten Konzentrationen ($[L]$ und $[EDTA]$) und der jeweiligen Komplexbindungskonstante von EDTA K_{EDTA} lässt sich unter Verwendung der folgenden Formel der K_D -Wert berechnen (siehe 2.5.2):

$$K_D = \frac{K_{EDTA} \cdot [M(EDTA)] \cdot [L]^n}{[M(L)_n] \cdot [EDTA]}$$

Daraus lässt sich wiederum der pM-Wert ermitteln:

$$pM = -\log_{10}(K_D) \cdot [L]/[L]^{n-1}$$

3.3.1 Untersuchung von Fe-(III)-Komplexen

Bei den ersten Untersuchungen wurde Fe^{3+} verwendet, das als essentielles Spurenelement eine große Bedeutung hat. Da Fe^{3+} farbige Metallkomplexe wie z.B. das Häm bildet, eignet es sich sehr gut als Modellkation. Als mögliche Liganden wurden die Verbindungen **24**, **25**, **26d**, **29** und **30** verwendet. Die Untersuchungen erfolgten bei pH 7,4 und 5,5. In Tab. 3.7 und 3.7 sind die Ergebnisse aufgeführt. Bei pH 7,4 wurden zum Vergleich die jeweiligen K_D - und pM-Werte bestimmt. Da dies bei pH 5,5 nicht möglich war, ist hier nur der Unterschied der Komplexkonzentrationen in den Ansätzen mit und ohne EDTA angegeben, wobei letztere als 100% definiert wurde.

Tabelle 3.7: Bildung von Fe-(III)-Komplexen mit verschiedenen Liganden bei pH 7,4

Für jeden Liganden, der zur Komplexbildung mit Fe^{3+} herangezogen wurde, ist das Absorptionsmaximum des dabei entstehenden Komplexes sowie der für diesen Komplex berechnete K_D - und pM-Wert angegeben.

Testsubstanz	λ [nm]	$K_D [\cdot 10^{-28} \text{ M}]$	pM
24	540-530	0,61	25,22
25	560-570	1,08	24,97
26d	580-590	1,46	24,84
29	480	0,46	25,34
30	470	0,14	25,85

Tabelle 3.8: Bildung von Fe-(III)-Komplexen mit verschiedenen Liganden bei pH 5,5

In dieser Tabelle sind für jeden Liganden, der zur Komplexbildung verwendet wurde, das Absorptionsmaximum des Komplexes und dessen relativer Anteil in einem Ansatz mit 0,2 mM EDTA aufgeführt. Eine vollständige Komplexbildung des Kations, wie sie im EDTA-freien Ansatz vorliegt, würde hierbei 100 % entsprechen.

Testsubstanz	λ [nm]	$\Delta\text{conc} [\%]$
25	570-600	74,31
26d	610-650	91,43
29	460-480	91,1

Die Durchführung des Tests bei pH 5,5 war mit **24** nicht möglich, da sich kein eindeutig bestimmtes Absorptionsmaximum ergab (siehe Abb 3.14). Bei **30** wurde von einer Untersuchung bei pH 5,5 abgesehen.

Ergebnisse

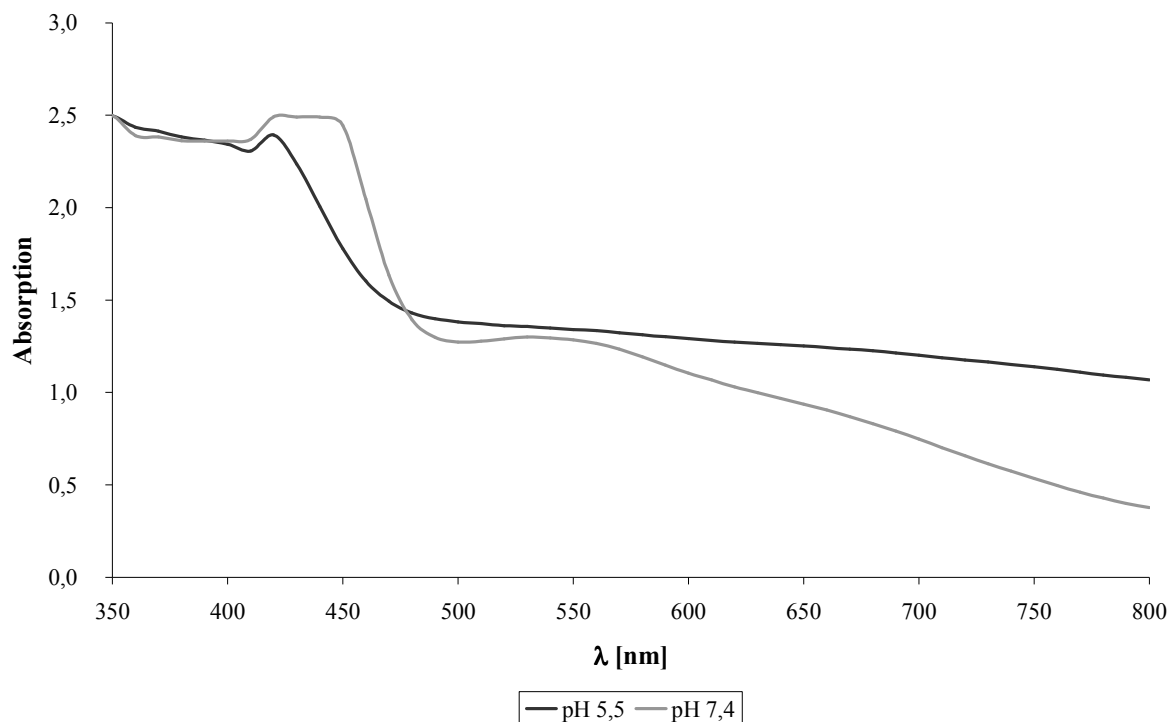


Abbildung 3.14: Absorptionsspektren des Eisenkomplexes von **24**

Zu sehen ist die Absorption einer 0,15 mM Lösung des Fe-(III)-Komplexes von **24** bei der jeweiligen Wellenlänge (350 bis 800 nm). Der pH-Wert lag bei 7,4 bzw. 5,5.

Zur Darstellung der Kinetik der Komplexbildung war für ausgewählte Verbindungen eine kontinuierliche Messung der Absorptionsänderung über 100 min durchgeführt worden. Die gemessene Wellenlänge entsprach hierbei dem jeweiligen Absorptionsmaximum. In Abb. 3.15 ist als Beispiel der für Ligand **25** gemessene Verlauf aufgeführt.

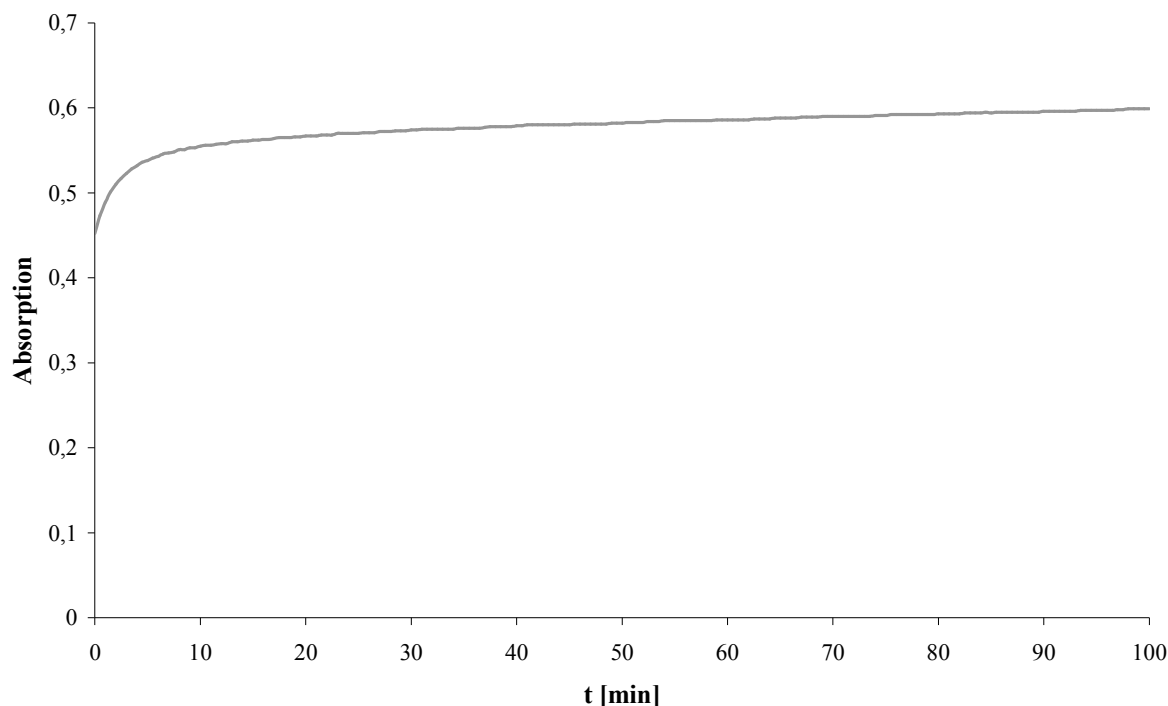


Abbildung 3.15: Kinetik der Komplexbildung

Dargestellt ist die Absorptionsänderung einer Mischung von Fe^{3+} und **25** bei 560 nm über einen Zeitraum von 100 min. Der pH-Wert lag bei 7,4.

3.3.2 Untersuchung von weiteren Metallkomplexen

Nach der Untersuchung potentieller Liganden hinsichtlich ihrer Affinität zu Fe^{3+} wurden weitere Kationen auf die gleiche Weise analysiert (siehe 2.5). Die Wahl fiel hierbei auf Mn^{2+} , Ni^{2+} und Pb^{2+} , die ebenfalls mit Biomolekülen interagieren können. Die Auswahl der verwendeten Liganden wurde auf das käuflich erworbene **25** beschränkt. Die Versuche wurden bei pH 7,4 durchgeführt. In Tab. 3.9 sind die Resultate dargestellt.

Tabelle 3.9: Bildung von Metallkomplexen mit 25

Für jedes Kation, das mit **25** komplexiert wurde, sind das Absorptionsmaximum des resultierenden Komplexes und der dafür berechnete K_D - und pM-Wert aufgelistet.

Kation	λ [nm]	K_D [M]	pM
Pb^{2+}	550	$1,75 \cdot 10^{-21}$	20,76
Ni^{2+}	390	$4,86 \cdot 10^{-22}$	21,31
Mn^{2+}	390	$2,08 \cdot 10^{-17}$	16,68

Ergebnisse

Es war bei dieser Analyse eine Inkubation bei 70° C notwendig, um eine sichtbare Veränderung zu erhalten (siehe 2.5.1). Die jeweilige Inkubationszeit war durch die Aufnahme von Absorptionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt worden. In Abb. 3.16 ist dies beispielhaft für den Komplex von **25** mit Mn^{2+} dargestellt.

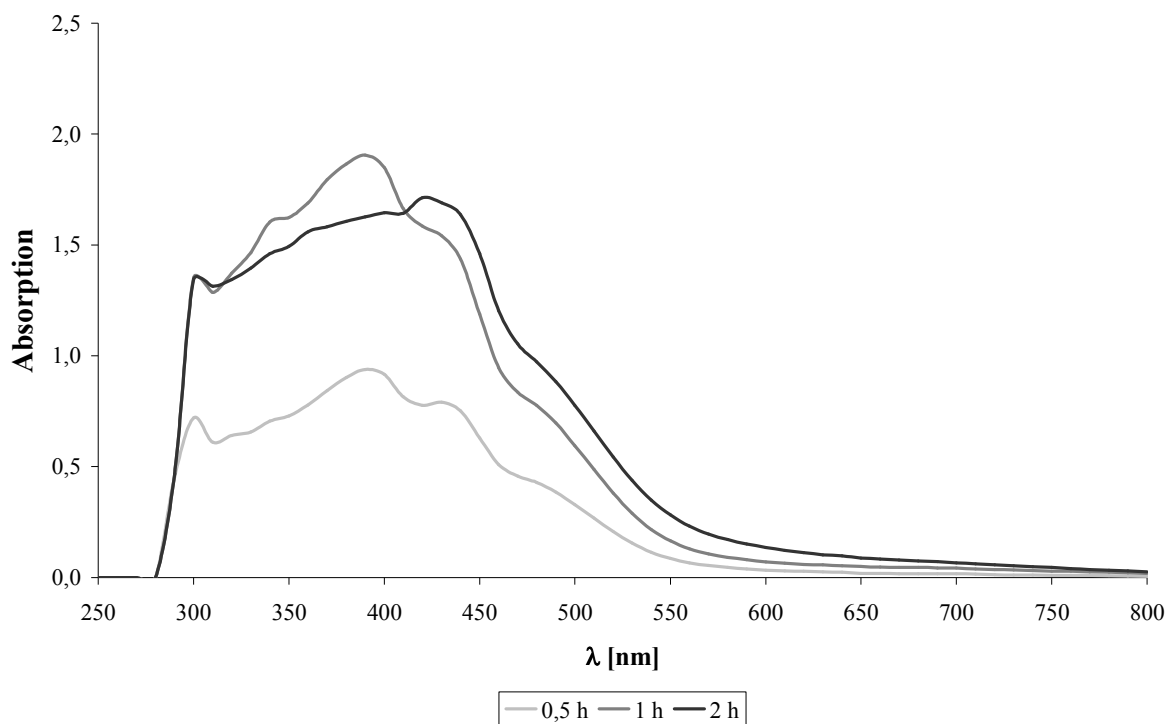


Abbildung 3.16: Absorptionsspektren des Mangankomplexes von 25

In dem Diagramm ist die Absorption einer Mischung von Mn^{2+} und **25** bei der jeweiligen Wellenlänge (250 bis 800 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten während einer Inkubation bei 70° C dargestellt.

3.4 Glutathion-Monitoring

Die spontane Reaktion der C8-Doppelbindung mit Thiolen wird als Ursache für die Toxizität von Illudin M **11** angesehen (siehe 1.2.6). Deshalb wurde die Kinetik dieses Vorgangs bei einigen Illudinderivaten **27** untersucht (siehe 2.6). Dazu wurden die Verbindungen mit GSH inkubiert und die Lösungen photometrisch untersucht, denn die besagte Doppelbindung weist eine charakteristische Absorption bei 330 nm auf. In Tab. 3.10 sind die erhaltenen Ergebnisse aufgeführt. Als Maß zum Vergleich dienen hierbei die Abbauraten a . Aus diesen kann man mit Hilfe der Formel $P = e^{-at}$ berechnen, wie viel von der relativen Absorption P nach Ablauf der Zeit t noch feststellbar ist. Die Absorption zu Beginn der Messung entspricht hierbei 100%. Um auszuschließen, dass ein Abbau unabhängig von GSH stattfindet, wurde der Versuch mit **11** auch unter Verwendung eines glutathionfreien Puffers durchgeführt.

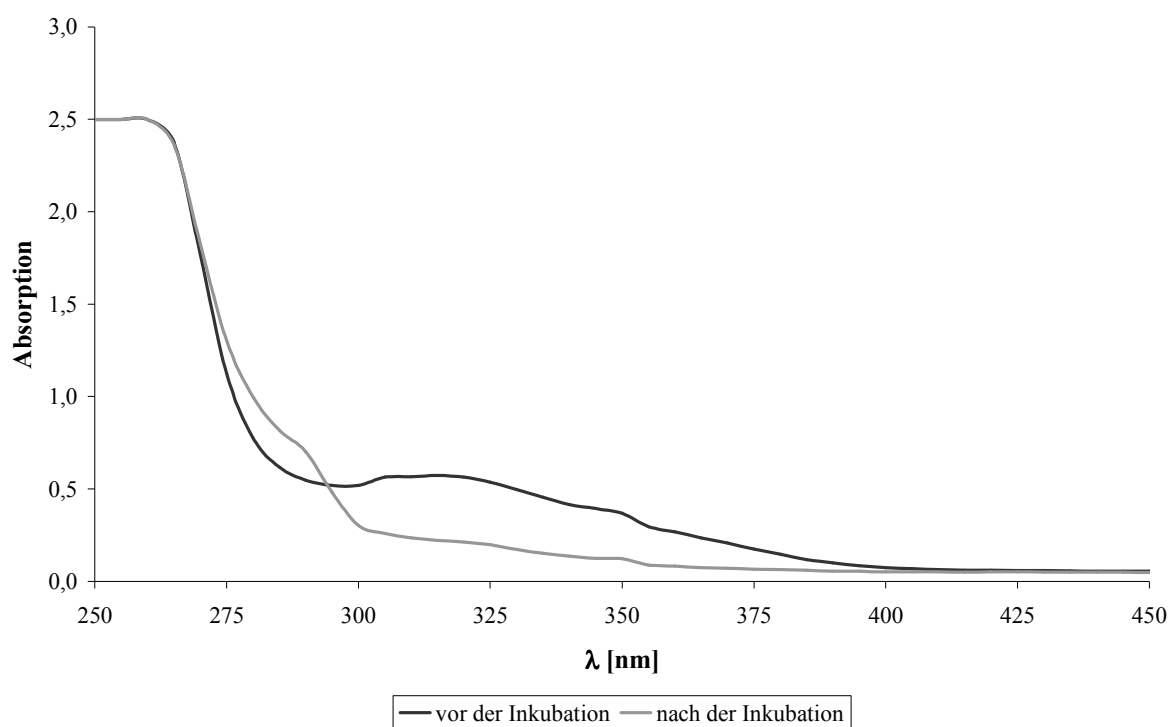
Tabelle 3.10: Abbauraten verschiedener Illudinderivate im Vergleich

Für Illudin M **11** sowie für jedes getestete Derivat **27** ist die jeweilige Abbaurrate a angegeben. Mit der Gleichung $P = e^{-at}$ kann man daraus berechnen, wie viel Prozent P von der Anfangsabsorption nach der Zeit t noch feststellbar sind.

Substanz	Abbaurrate a [$\cdot 10^{-4}$]	Substanz	Abbaurrate a [$\cdot 10^{-4}$]
11 (ohne GSH)	0,9	27g	10
11 (mit GSH)	209	27h	-2
27a	0,2	27i	0,06
27b	3	27j	9
27c	-3	27k	0,2
27d	9	27m	-16
27e	16	27n	-11
27f	8		

Ein erwähnenswerter Abbau liegt nur bei **11** vor. Um eine Verschiebung des Absorptionsmaximums aufgrund der Derivatisierung auszuschließen, wurden Absorptionsspektren der Ansätze vor und nach der Inkubation mit GSH angefertigt. Als Beispiel hierfür sind in Abb. 3.17 Spektren von **11** und **27a** abgebildet.

A



B

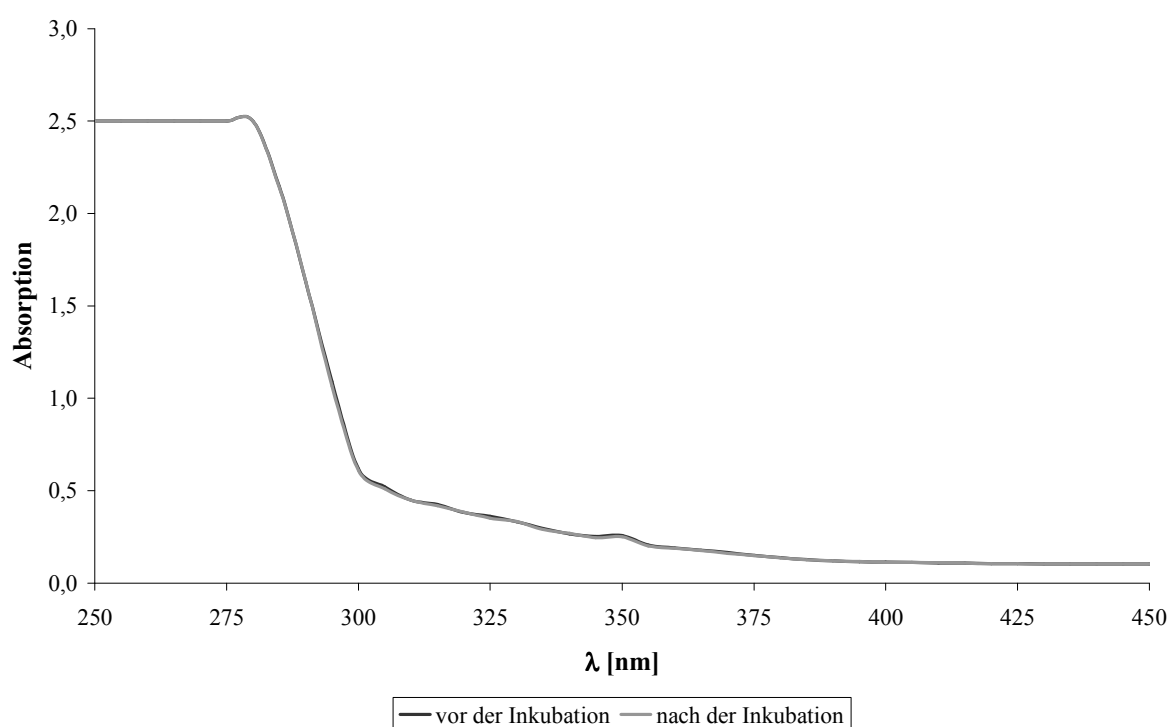


Abbildung 3.17: Absorptionsspektren von **11 und **27a****

Die Teilbilder zeigen die Absorption eines Ansatzes bei der jeweiligen Wellenlänge (250 bis 450 nm) vor und nach der Inkubation mit GSH. Untersucht wurden 0,2 mM Lösungen der jeweiligen Substanz in PBS mit 6,5 mM GSH. In Teilbild A sind die für **11**, in Teilbild B die für **27a** gemessenen Spektren aufgeführt.

3.5 Vergleich des Alkylierungspotentials

Die cytotoxische Wirkung von **11** basiert auf der Fähigkeit die DNA zu alkylieren. Deshalb wurde versucht ein Verfahren zu finden, mit dem man diesen Vorgang nachweisen und quantifizieren kann. Zu diesem Zweck wurden zwei Varianten eines Alkylierungsassays hinsichtlich ihrer praktischen Durchführbarkeit und Aussagekraft überprüft. Das Grundprinzip beider Methoden ist gleich: Nicotinamid wird von der zu testenden Verbindung alkyliert und das entstehende Zwischenprodukt in ein nachweisbares Endprodukt überführt. Je mehr Nicotinamid in einer vorgegebenen Zeit umgesetzt wird, desto größer ist das Alkylierungspotential der Testsubstanz. Beim Alkylierungsassay mit Aceton **39** lässt sich der Umsatz über die Absorption des Produkts bestimmen, bei dem mit Acetophenon **39a** über seine Fluoreszenz (siehe 2.7).

3.5.1 Der Alkylierungsassay mit Aceton

3.5.1.1 Lösungsmittelleffekte

Bevor die Untersuchung der Testsubstanzen erfolgte, wurden zunächst verschiedene Parameter des Tests analysiert. So sollte festgestellt werden, welchen Effekt das Lösungsmittel hat. Untersucht wurden DMF und PBS. Als Referenzsubstanz wurde das bekannte Alkylanz Epichlorhydrin **34** verwendet. Zum Vergleich wurden die EC_{50} -Werte ermittelt (siehe Tab. 3.11). Der EC_{50} entspricht der Substanzkonzentration, durch die in der vorgegebenen Zeit 50% des Substrats umgesetzt werden (siehe 2.7.1).

Tabelle 3.11: Einfluss des Lösungsmittels auf das Alkylierungspotential von **34**

Angegeben ist der EC_{50} -Wert in Abhängigkeit vom jeweiligen Lösungsmittel. Dieser wurde mit der Gleichung $Abs = ac$ berechnet. Dabei handelt es sich um die Gleichung der Ausgleichsgeraden, die man erhält, wenn man die Absorption Abs gegen die eingesetzte Konzentration c aufträgt (siehe Abb. 2.31). Der Faktor a sowie der R^2 -Wert der Geradengleichung sind ebenfalls mit aufgeführt.

Lösungsmittel	EC_{50} [mM]	a	R^2
DMF	1,45	0,66	0,9959
PBS	1,80	0,53	0,9971

Die Fähigkeit Nicotinamid **33** zu alkylieren ist um 20% größer, wenn die Testsubstanz in DMF gelöst ist. Im Folgenden wurde immer DMF als Lösungsmittel gewählt.

3.5.1.2 Einfluß der Inkubationszeit

Die Inkubationszeit war anfangs willkürlich auf 30 min festgelegt worden. Bei weiteren Versuchen wurde überprüft, wie sich ihre Veränderung bei einer konstanten Konzentration von 2 mM auswirkt. Als Maß für die Alkylierungsrate diente hierbei die Absorption, wobei der maximale Wert von 1,92 AU gleich 100% gesetzt wurde. Die Temperatur blieb unverändert bei 60° C, die Referenzsubstanz war wieder Epichlorhydrin **34**. Abb. 3.18 zeigt die ermittelten Resultate.

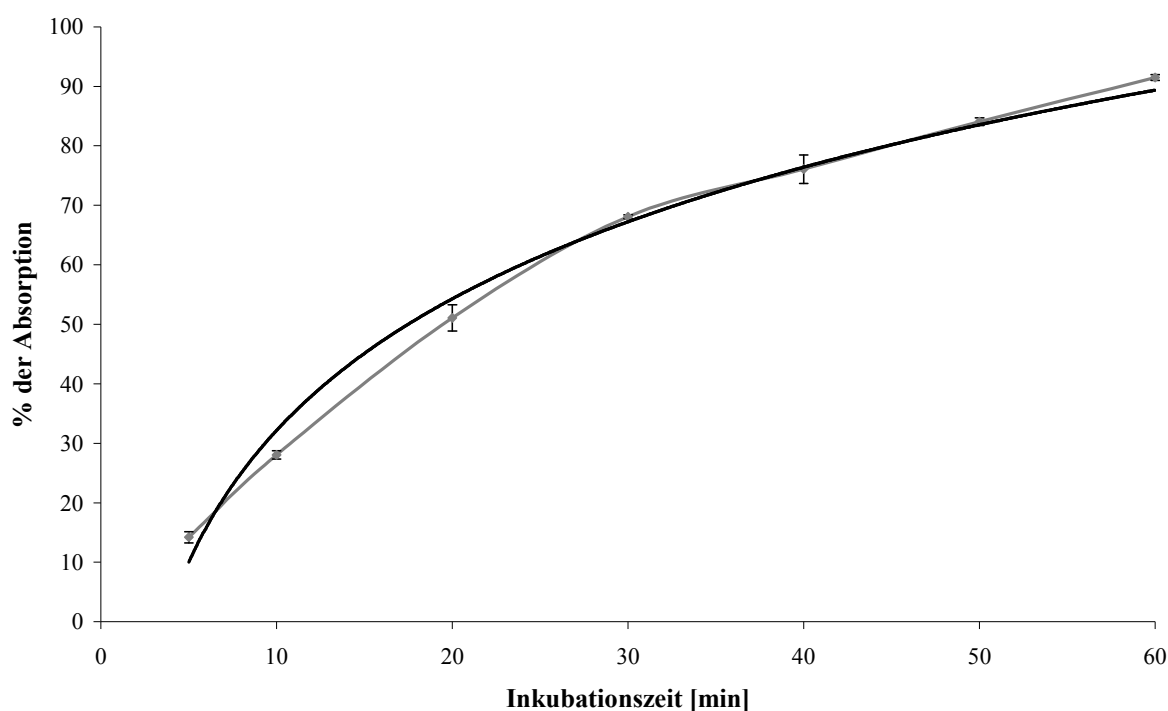


Abbildung 3.18: Änderung der Absorption in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In dem Diagramm wurde die Absorption nach Beendigung der Nachweisreaktion in Abhängigkeit von der jeweiligen Inkubationszeit aufgetragen. Der Maximalwert, der bei einem vollständigen Umsatz erreicht wird, wurde als 100% definiert. Es ergab sich ein logarithmischer Zusammenhang. Dieser lässt sich durch die Gleichung $P = 31,925 \ln(t) - 41,347$ ($R^2 = 0,9902$) beschreiben. P steht hierbei für den prozentualen Anteil der Absorption in Bezug auf den Sättigungswert und t für die Inkubationszeit in min.

Anhand der Trendlinie kann man analog zum EC_{50} nun die Inkubationsdauer ermitteln, nach der 50% des Substrats umgesetzt sind. Es ergibt sich eine Zeit von 17,5 min.

3.5.1.3 Test von Illudinderivaten

Nach der Festlegung der Rahmenbedingungen, wurden einige ausgewählte Illudinderivate mit dieser Methode untersucht. Die Wahl fiel auf diese Substanzklasse, weil die alkylierende Wirkung der Muttersubstanz Illudin M **11** bereits bekannt ist. Da alle getesteten Verbindungen eine Gelbfärbung aufwiesen, wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um feststellen zu können, ob durch die Eigenabsorption das Ergebnis verfälscht werden könnte. Hierbei wurden 0,5 mM Lösungen in DMF untersucht. Die Spektren sind in Abb. 3.19 abgebildet.

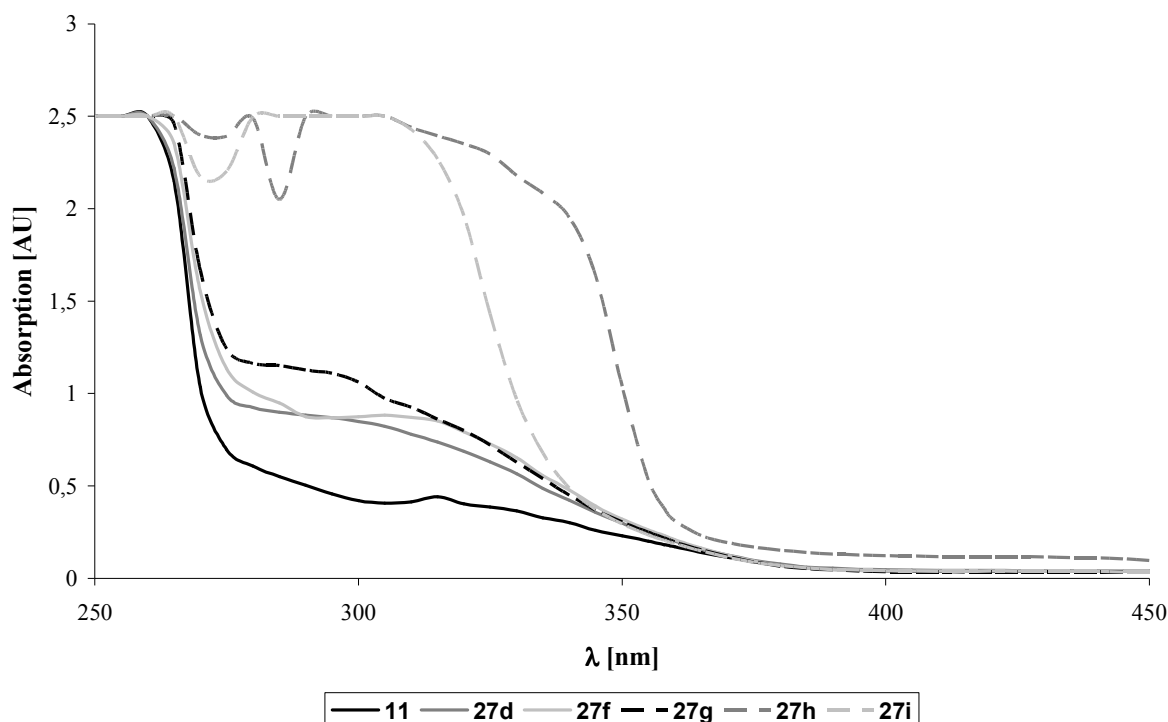


Abbildung 3.19: Absorptionsspektren von Illudinderivaten

Zu sehen ist die Absorption von 0,5 mM Lösungen verschiedener Illudinderivate **27** und der Muttersubstanz **11** bei der jeweiligen Wellenlänge (250 bis 450 nm).

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass alle getesteten Illudinderivate **27** eine geringe Absorption bei 358 nm aufweisen. Um den Alkylierungsassay mit diesen Verbindungen dennoch durchführen zu können, wurde ihre Eigenabsorption bei den untersuchten Substanzkonzentrationen bestimmt und diese dann von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben, Inkubationszeit und -temperatur betrugen unverändert 30 min bzw. 60° C. In Tab. 3.12 sind die bereinigten Ergebnisse aufgeführt. Als Maß diente wie schon bei der Bewertung des Lösungsmiteleinflusses der EC_{50} .

Tabelle 3.12: EC_{50} -Werte verschiedener Illudinderivate im Vergleich mit 34

Für jede getestete Verbindung ist der ermittelte EC_{50} -Wert sowie der zugehörige Faktor a aufgelistet. Anhand der Geradengleichung $Abs = ac$, mit Absorption Abs und Substanzkonzentration c , lässt sich der EC_{50} berechnen. Der R^2 -Wert dieser Gleichungen ist ebenfalls mit aufgeführt.

Substanz	EC_{50} [mM]	a	R^2
34 (DMF)	1,45	0,6598	0,9959
11	9,02	0,1064	0,991
27d	1,88	0,51	0,9589
27f	1,85	0,5188	0,9976
27g	1,65	0,5815	0,9735
27h	2,27	0,422	0,99
27i	3,33	0,2884	0,8903

Bei ausgewählten Testsubstanzen wurden die EC_{50} -Werte zum Vergleich vor und nach Abzug der Eigenabsorption bestimmt (siehe Tab. 3.13).

Tabelle 3.13: EC_{50} -Werte verschiedener Illudinderivate im Vergleich

Angegeben sind EC_{50} -Werte verschiedener Testsubstanzen. Die unbereinigten EC_{50} wurden anhand der Rohdaten ohne Berücksichtigung der Eigenabsorption ermittelt. Zur Bestimmung der bereinigten EC_{50} wurde diese von den Messwerten abgezogen.

Substanz	EC_{50} [mM]	
	bereinigt	unbereinigt
11	9,02	2,16
27b		0,65
27f	1,85	1,08
27i	3,33	2,23

Bei **27b**, dem Ester von **11** und Vitamin-A-Säure, ergaben sich nach Abzug der Eigenabsorption keinerlei brauchbare Messwerte mehr.

3.5.2 Der Alkylierungsassay mit Acetophenon

Die hier präsentierten Ergebnisse wurden mit Hilfe der unter 2.7.2 beschriebenen Methode ermittelt. Bei dieser Variante wird die Fluoreszenz des Produkts gemessen, weshalb man keinen Sättigungswert feststellen und folglich auch keinen EC_{50} bestimmen kann. Darum wurde zum Vergleich der getesteten Verbindungen das Alkylierungspotential in Relation zur Referenzsubstanz **34** betrachtet. Die im Ansatz mit **34** festgestellte Fluoreszenz wurde dazu als 100%, die in dem Kontrollansatz mit DMSO als 0% definiert. Untersucht wurden die Substanzen **27n**, ein acetylgeschütztes Illudinlacton und Benzylbromid **40** (siehe Tab. 3.14). Da die bei der Untersuchung von **40** festgestellte Fluoreszenz den Messbereich des Geräts überstieg, war der Ansatz vor weiteren Messungen 1:40 und 1:200 mit Puffer verdünnt worden.

Tabelle 3.14: Alkylierungspotentiale von 40 und 27n

In der Tabelle ist das Alkylierungspotential von **27n** und **40** in Bezug auf **34** angegeben. Die für **34** gemessene Fluoreszenz entspricht dabei 100%. Die Werte entstammen drei unabhängigen Versuchen, die zugehörige Standardabweichung ist mit aufgelistet.

Substanz	%	Stabw.
27n	-0,06	3,42
40	15219,62	18021,75

Man kann erkennen, dass bei beiden Testsubstanzen eine extrem große Standardabweichung vorliegt. Dies zeigt, dass der Assay keine zuverlässigen Ergebnisse liefert, weshalb auch von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

3.6 Der TUNEL-Test

3.6.1 Methodenentwicklung für den TUNEL-Test mit HL 60-Zellen

Um Apoptose bei Krebszellen nachzuweisen, wurden verschiedene Tests durchgeführt. Der TUNEL-Test weist die bei der Apoptose auftretende Fragmentierung der DNA nach, indem mit Fluorescein markierte dUTP-Nukleotide von dem Enzym Terminale Transferase an die freien 3'-Enden angehängt werden. Auf diese Weise markierte, apoptische Zellen weisen eine starke Fluoreszenz auf, die mikroskopisch detektierbar ist. Da diese Analysemethode seit längerem etabliert und standardisiert ist, sind die dafür benötigten Komponenten als gebrauchsfertiges Testkit im Handel erhältlich. Es wurde ein Testkit der Firma Roche verwendet und die Zellen wurden wie in der mitgelieferten Gebrauchsanweisung beschrieben behandelt (siehe 2.9.2). Da dabei eine Zellschädigung festgestellt wurde, die eine Auswertung der Aufnahmen unmöglich machte (siehe Abb. 3.20), wurde eine Variante des Tests hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit überprüft (siehe 2.9.1). Diese stellte die bessere Alternative dar und wurde deshalb für alle weiteren Untersuchungen beibehalten. Bei der Entwicklung dieser Methode wurde der Reaktionsmix durch PBS ersetzt, Zellen wurden ohne vorherige Inkubation mit einer Testsubstanz verwendet.

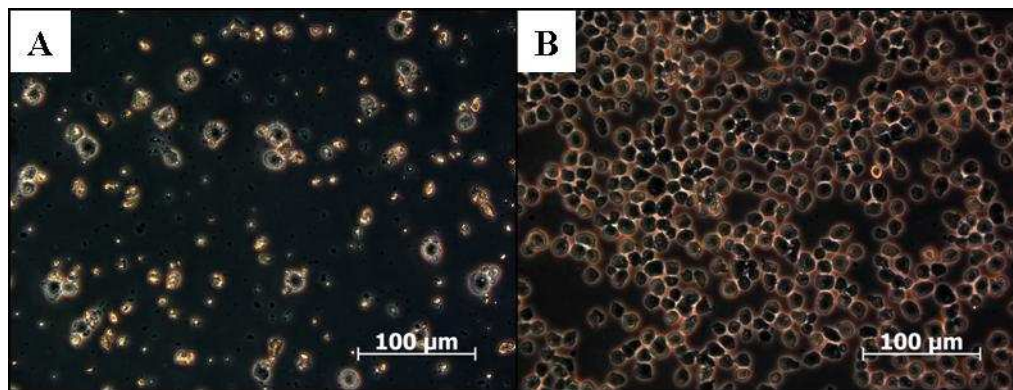


Abbildung 3.20: Vergleich zweier Methoden der Durchführung des TUNEL-Tests

Zu sehen sind Hellfeldaufnahmen von unbehandelten HL 60-Zellen, mit denen der TUNEL-Test durchgeführt worden ist. Teilbild A zeigt Zellen, die gemäß der Gebrauchsanweisung behandelt worden sind (siehe 2.9.2). Bei Teilbild B wurde mit den Zellen wie von Jobmann beschrieben verfahren (siehe 2.9.1). Anstelle des Reaktionsmix wurde in beiden Fällen PBS verwendet. Man erkennt in Teilbild A viele Zelltrümmer und nur wenige unbeschädigte Zellen. In Teilbild B sind alle Zellen intakt.

3.6.2 Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den HL 60-Zellen

Mit dem TUNEL-Test wurde eine Vielzahl von Verbindungen hinsichtlich ihrer apoptoseinduzierenden Wirkung getestet. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 3.21 exemplarisch eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen zu sehen, mit denen der TUNEL-Test durchgeführt wurde. Als Testsubstanz wurde hierbei das Menthol-Platinkomplexkonjugat **13a** verwendet, das neben Cisplatin **1** als Positivkontrolle fungierte.

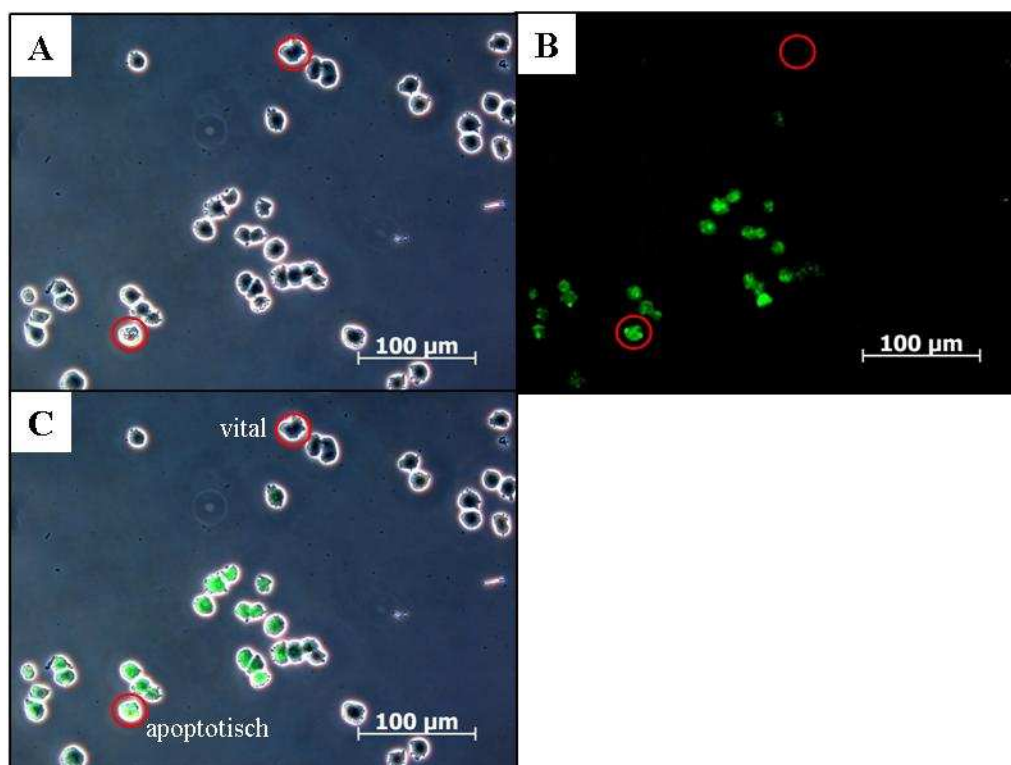


Abbildung 3.21: Der TUNEL-Test

Zu sehen sind mikroskopische Aufnahmen von Zellen, an denen der TUNEL-Test durchgeführt wurde. Teilbild A zeigt eine Hellfeldaufnahme, Teilbild B eine grüne Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs. Teilbild C entsteht durch Überlagerung der beiden Teilbilder. Es sind sowohl eine apoptotische als auch eine vitale Zelle markiert.

In Tab. 3.15 bis 3.17 sind die beim TUNEL-Test an den HL 60-Zellen erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 3.15: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den HL 60-Zellen

Für die Negativkontrolle, Cisplatin **1**, die Platinkomplexkonjugate **13** und **15** sowie für das Rutheniumkomplexkonjugat **14** ist der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben, der beim TUNEL-Test festgestellt wurde. Ebenfalls mit aufgeführt ist die zugehörige Standardabweichung.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	14,2	10,0
1	38,6	22,6
13a	47,9	19,0
13b	27,2	15,8
13c	33,5	19,7
13d	34,4	13,6
13e	71,3	15,0
13f	13,1	12,1
13g	51,4	9,8
13h	15,9	13,5
13i	32,9	4,7
13j	11,9	9,3
13k	48,2	8,5
13l	37,0	23,3
13m	5,2	3,1
13n	19,9	30,0
13o	36,3	13,0
14	39,0	30,8
15a	53,0	31,4
15b	30,0	5,2
15c	53,8	23,0
15d	40,9	31,9
15e	52,6	17,1
15f	58,8	5,7
15g	57,4	17,6
15h	45,5	18,9
15i	28,1	10,2
15j	20,4	12,8
15k	49,5	17,9
15l	44,4	22,6
15m	42,4	13,3
15n	33,3	16,6

Tabelle 3.16: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den HL 60-Zellen

Es ist für jede Verbindung der beim TUNEL-Test ermittelte prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl mit der jeweiligen Standardabweichung aufgelistet. Die getesteten Verbindungen waren Hormonderivate (**16** und **17**) und Combretastatinanaloga (**20** bis **23** und **26**).

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	14,2	10,0
16a	29,9	24,3
16b	25,7	13,1
16d	4,0	0,1
17	46,4	4,7
20	43,0	8,6
20a	26,6	0,9
21a	49,1	16,1
21b	35,8	10,1
21c	20,3	16,5
21d	33,8	1,7
22	27,5	11,4
23	47,0	10,8
26a	6,1	5,9
26b	48,6	0,5
26c	73,7	5,1
26d	23,8	4,2
26e	65,9	14,1
26f	3,3	3,4
26g	70,7	7,1
26h	59,7	0,5
26i	65,1	1,0
26j	72,1	4,1
26k	65,0	17,3
26l	62,1	8,9
26m	67,9	13,9

Ergebnisse

Tabelle 3.17: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den HL 60-Zellen

In der Tabelle sind für jedes Illudinderivat **27** der beim TUNEL-Test festgestellte Anteil apoptotischer Zellen und die jeweilige Standardabweichung aufgeführt.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	14,2	10,0
11	70,6	13,4
27b	93,2	5,5
27d	47,2	12,2
27e	96,8	3,2
27f	90,5	7,8
27g	93,9	4,0
27h	43,8	16,1
27i	95,4	4,1
27j	43,9	12,9
27k	54,9	20,4
27l	67,4	7,4
27m	72,6	12,6
27n	65,3	11,6

Abb. 3.22 zeigt die Resultate von Tab. 3.15, Abb. 3.23 die von Tab. 3.16 und 3.17 als Diagramm.

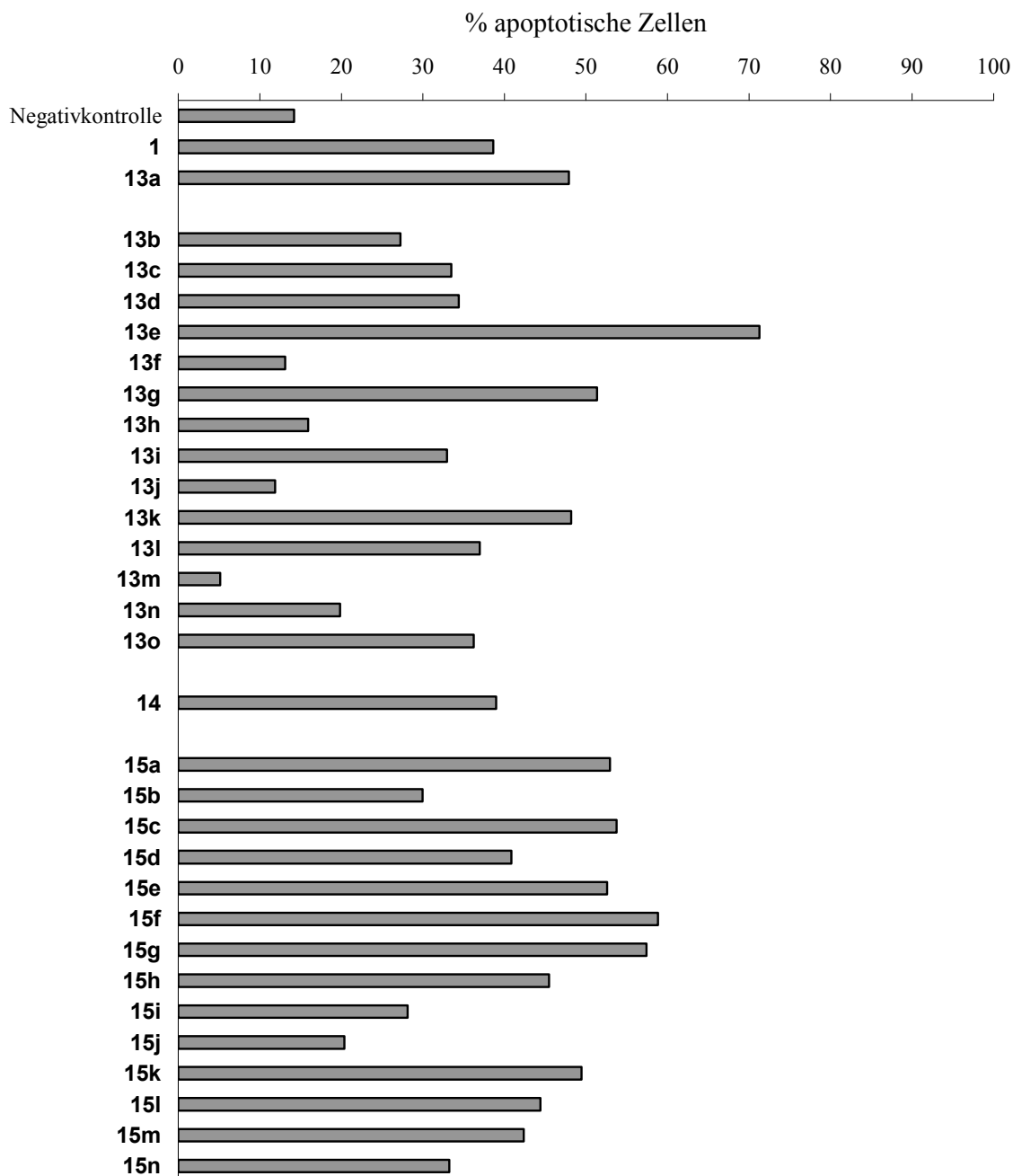


Abbildung 3.22: Der TUNEL-Test an den HL 60-Zellen

Die Ergebnisse aus Tab. 3.15 sind hier in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Für die Verbindungen ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben. Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.

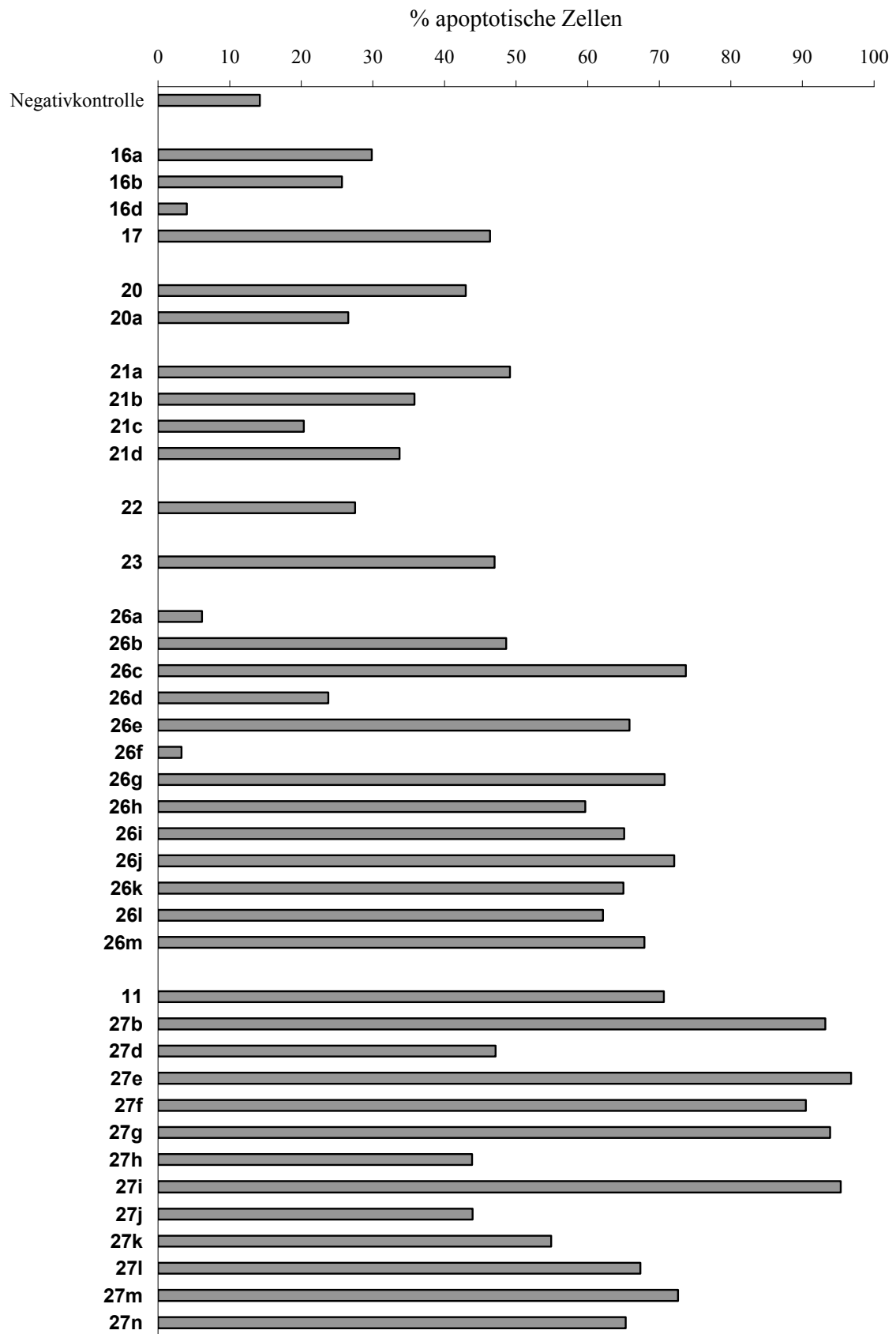


Abbildung 3.23: Der TUNEL-Test an den HL 60-Zellen

Zu sehen sind die Ergebnisse aus Tab. 3.16 und 3.17 in Form eines Balkendiagramms.

3.6.3 Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den 518 A2-Zellen

Auch die adhärenenten Melanomzellen 518 A2 wurden mit dem TUNEL-Test untersucht. Dies erfolgte wie unter 2.9.3 beschrieben. Da sich die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kaum von denen unterscheiden, die man von den HL 60-Zellen erhält, wurde auf ein Beispielbild wie Abb. 3.21 verzichtet. In Tab. 3.18 und 3.19 sind die Ergebnisse aufgeführt, Abb. 3.24 zeigt sie als Diagramm.

Tabelle 3.18: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den 518 A2-Zellen

Für jedes Platinderivat **15** bzw. jedes Chalkon **20**, **21** und **23** ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben. Daneben sind auch die für die Negativkontrolle (PBS) und für die Positivkontrollen **1** und **13a** ermittelten Werte mit aufgeführt.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	10,3	10,0
1	13,5	8,7
13a	40,2	20,3
15g	39,3	7,0
15h	29,5	11,4
15i	19,6	7,5
15j	15,2	7,9
15l	28,8	5,1
15m	35,6	9,9
20	52,7	7,4
20a	15,6	10,6
21a	56,6	11,3
21b	14,8	4,3
21c	20,0	7,1
21d	19,6	4,9
23	14,2	9,0

Ergebnisse

Tabelle 3.19: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den 518 A2-Zellen

Für jedes Illudinderivat **27** sowie für die Ursprungsverbindung Illudin M **11** ist der Anteil an apoptotischen Zellen mit der jeweiligen Standardabweichung aufgelistet.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	10,3	10,0
11	71,5	3,2
27b	32,4	12,3
27d	21,3	5,1
27e	50,9	7,6
27f	36,5	16,9
27g	24,5	15,1
27h	23,0	10,0
27i	54,8	25,5
27j	29,9	10,7
27k	68,2	23,5
27m	66,0	20,4
27n	64,3	16,1

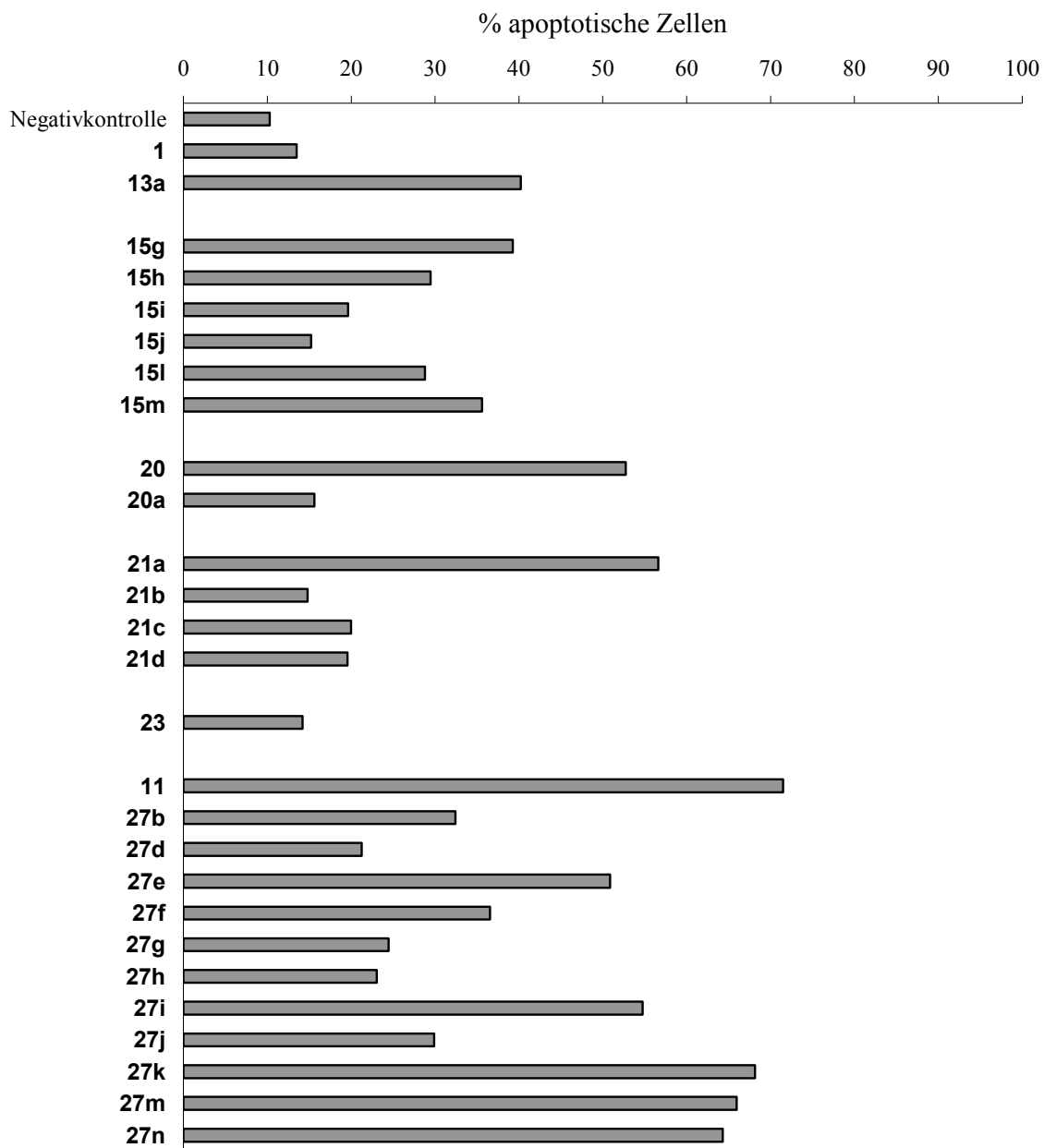


Abbildung 3.24: Der TUNEL-Test an den 518 A2-Zellen

Es sind die Ergebnisse aus Tab. 3.18 und 3.19 in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

3.6.4 Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den Kb-V1-Zellen

Analog zu den 518 A2-Zellen erfolgte der TUNEL-Test mit den Kb-V1-Zellen (siehe 2.9.3). Auch hier wurde auf ein Beispielbild verzichtet. In Tab. 3.20 sind alle für diese Zelllinie erhaltenen Resultate aufgeführt, in Abb. 3.25 sind sie als Diagramm dargestellt.

Tabelle 3.20: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den Kb-V1-Zellen

In der Tabelle sind für jede Testsubstanz der beim TUNEL-Test mit den Kb-V1-Zellen ermittelte Anteil an apoptotischen Zellen und die zugehörige Standardabweichung angegeben.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	1,6	1,5
13a	4,9	5,8
11	79,8	9,1
27j	39,2	32,9
27k	72,0	7,2

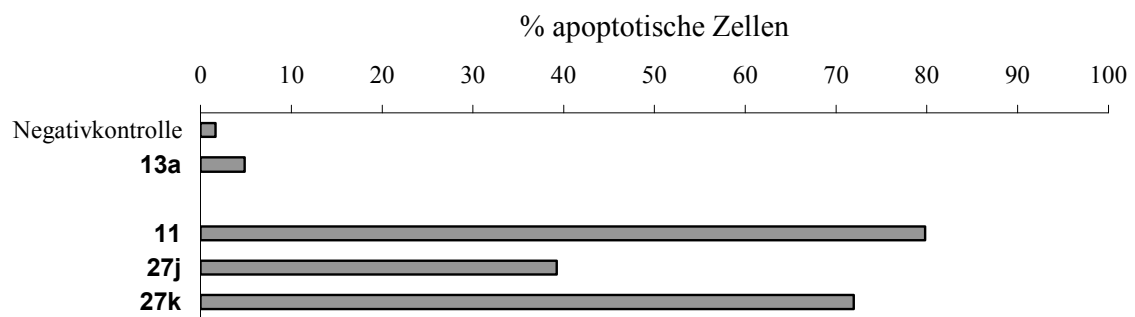


Abbildung 3.25: Der TUNEL-Test

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus Tab. 3.20 als Balkendiagramm.

3.6.5 Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den MCF-7-Zellen

Die Untersuchung der MCF-7-Zellen wurde wie unter 2.9.3 beschriebenen durchgeführt. Die festgestellten Ergebnisse sind in Tab. 3.21 und Abb. 3.26 zu sehen.

Tabelle 3.21: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den MCF-7-Zellen

Für die Negativkontrolle, Illudin M **11** und den entsprechenden Ferrocendiester **27k** ist der bei der Untersuchung der Zellen festgestellte Anteil an apoptotischen Zellen angegeben. Die zugehörige Standardabweichung ist ebenfalls mit aufgeführt.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	2,4	2,0
11	61,7	23,6
27k	45,3	11,4

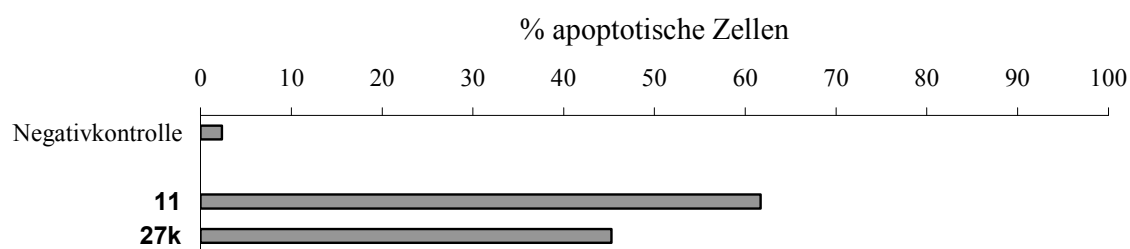


Abbildung 3.26: Der TUNEL-Test an den MCF-7-Zellen

In der Abbildung sind die Ergebnisse aus Tab. 3.21 als Balkendiagramm dargestellt.

3.6.6 Ergebnisse des TUNEL-Tests mit den HT 29-Zellen

Auch an den HT 29-Zellen war der TUNEL-Test wie unter 2.9.3 beschrieben vorgenommen worden. Die Resultate sind Tab. 3.22 und Abb. 3.27 zu entnehmen. Die Wirkung des Sulfons **26f** wurde auch bei gleichzeitiger Verabreichung des Inhibitors MK 571 untersucht.

Tabelle 3.22: Ergebnisse des TUNEL-Tests an den HT 29-Zellen

Für die Oxazole **26** und Illudine **27** ist der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl mit Standardabweichung angegeben. Es waren auch die jeweiligen Muttersubstanzen Combretastatin A-4 **7a** und Illudin M **11** mit untersucht worden.

	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	45,0	11,6
7a	46,5	23,8
26e	71,1	2,9
26f	57,5	10,4
26f + MK 571	75,1	12,7
26g	24,0	4,3
26h	55,6	4,8
26i	31,8	2,9
26j	49,1	10,0
26k	67,4	3,5
26l	48,7	9,1
26m	43,9	6,3
11	65,1	0,8
27f	76,8	1,1
27g	76,8	1,8
27i	68,4	15,1
27j	78,4	6,1
27k	73,2	6,8
27l	62,7	7,7
27m	75,7	18,9

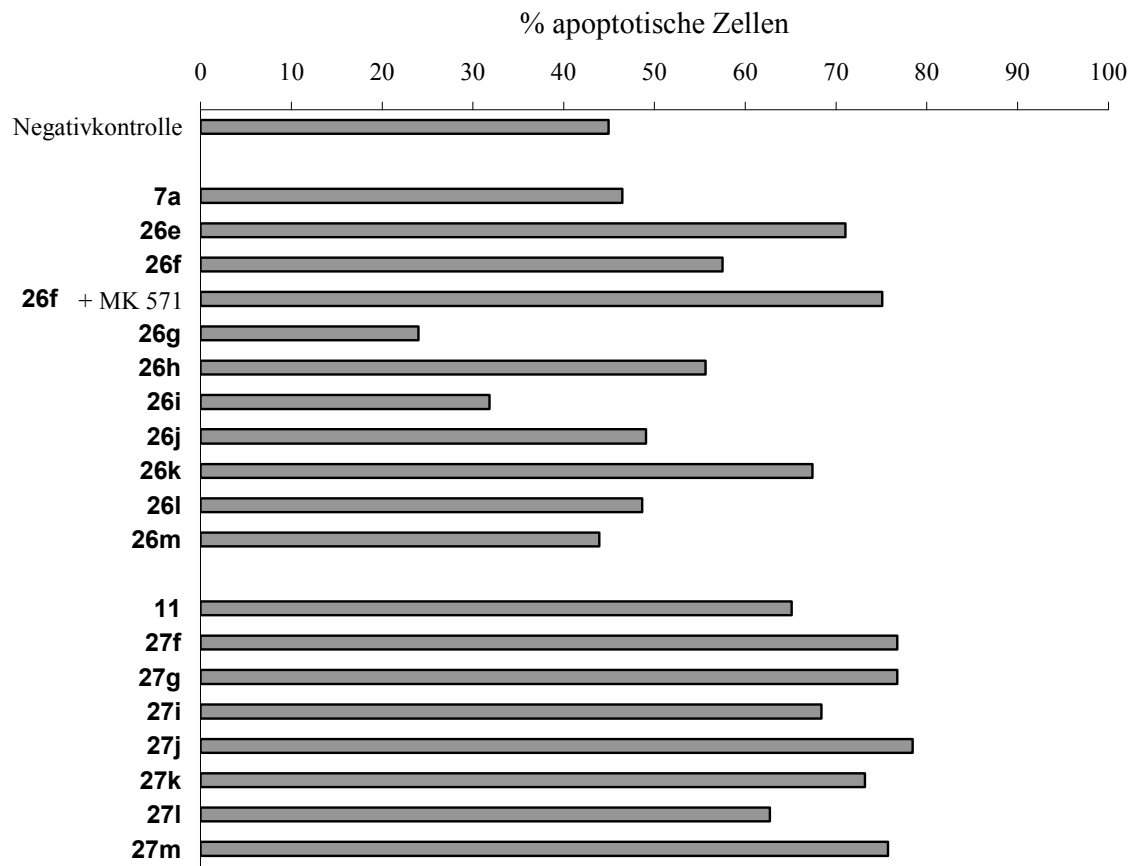


Abbildung 3.27: Der TUNEL-Test an den HT-29-Zellen

Zu sehen sind die Ergebnisse aus Tab. 3.22 in Form eines Balkendiagramms

3.6.7 Der TUNEL-Test mit einer Substanzkonzentration entsprechend dem IC_{50} -Wert

Beim TUNEL-Test wurden die Testsubstanzen normalerweise in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt, um einen deutlich sichtbaren Anteil an apoptotischen Zellen zu erhalten. Eine Reihe von Verbindungen wurde aber auch dahingehend getestet, wie sie sich verhalten, wenn die Konzentration dem jeweiligen IC_{50} -Wert für 24 h entspricht. Die Inkubationszeit wurde dementsprechend angeglichen, die verwendete Zelllinie war 518 A2. In Tab. 3.23 und Abb. 3.28 sind die auf diese Weise gewonnen Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 3.23: Ergebnisse des TUNEL-Tests bei einer Konzentration entsprechend dem IC_{50} -Wert

Bei den in der Tabelle aufgeführten Verbindungen, entsprach die eingesetzte Konzentration dem IC_{50} für 24 h. Für jede dieser Substanzen ist der Anteil an apoptotischen Zellen, der bei diesen Untersuchungen festgestellt wurde, mit der jeweiligen Standardabweichung aufgeführt.

Substanz	% apoptotische Zellen	Standardabweichung
Negativkontrolle	10,4	2,7
13a	41,7	3,6
11	49,4	8,0
27j	47,5	2,2
27k	54,0	11,7

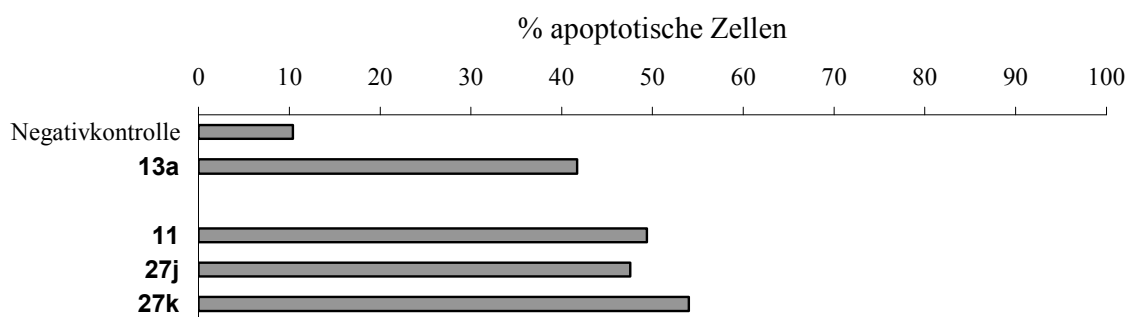


Abbildung 3.28: Der TUNEL-Test bei einer Konzentration entsprechend dem IC_{50} -Wert

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus Tab. 3.23 als Balkendiagramm.

3.7 Der Annexin-V-Fluos-Test

3.7.1 Der Annexin-Test an den HL 60-Zellen mit einer Inkubationszeit von 6 h

Ein weiterer Test zum Nachweis von Apoptose ist der Annexin-Test. Mit Annexin, an das Fluorescein gebunden ist, wird dabei Phosphatidyl-Serin in der Zellmembran markiert. Es befindet sich bei vitalen und nekrotischen Zellen an der Innenseite, bei apoptotischen an der Außenseite der Membran. Um Nekrose auszuschließen, wurde eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid vorgenommen. Dieser Interkalator kann nur die geschädigten Membranen nekrotischer Zellen durchdringen. Da es sich auch hierbei um einen etablierten Test handelt, konnte ein fertiges Testkit der Firma Roche verwendet werden. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.10.1 beschrieben. In Abb. 3.29 sind als Beispiel fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu sehen, wie sie im Rahmen des Tests angefertigt wurden.

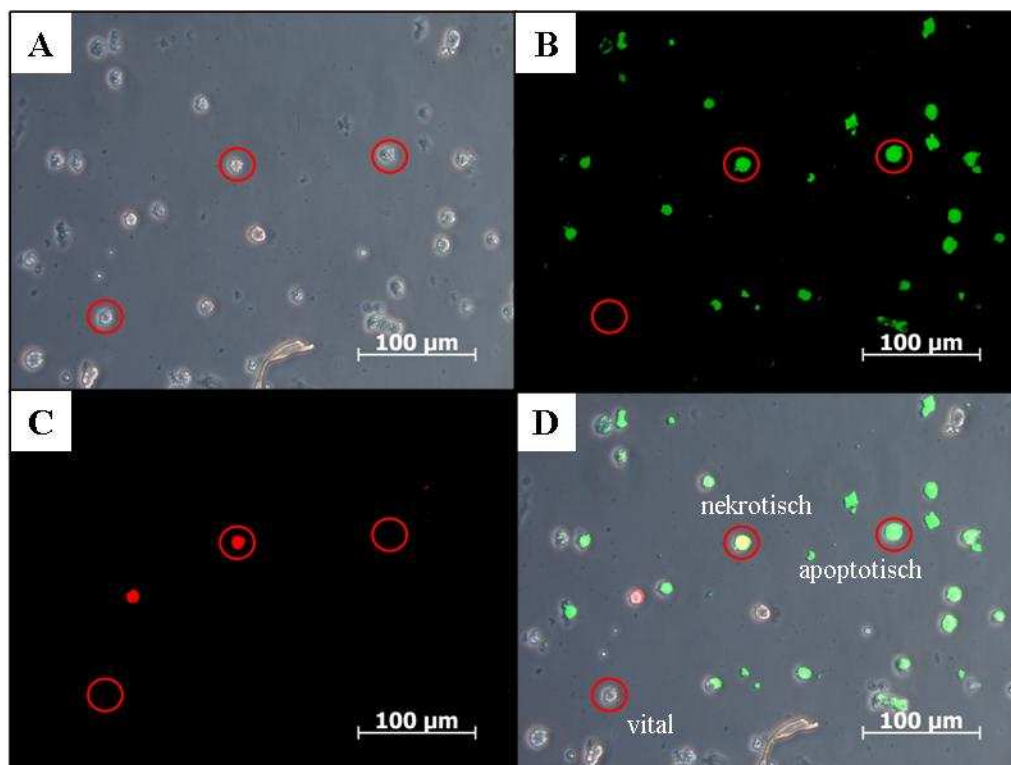


Abbildung 3.29: Der Annexin-Test

Es sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen abgebildet, an denen der Annexin-Test durchgeführt worden ist. Als Testsubstanz wurde dabei **13a** verwendet. Teilbild A zeigt eine Hellfeldaufnahme, Teilbild B eine grüne und Teilbild C eine rote Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs. Teilbild D entsteht, wenn man die einzelnen Teilbilder übereinanderlegt. Es sind eine apoptotische (grüne Fluoreszenz), eine nekrotische (rote und grüne Fluoreszenz) und eine vitale Zelle (keine Fluoreszenz) gekennzeichnet.

Ergebnisse

In Tab. 3.24 und 3.25 sind die Ergebnisse der Annexin-Tests an den HL 60-Zellen wiedergegeben. Abb. 3.30 zeigt diese als Diagramm.

Tabelle 3.24: Ergebnisse des Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 6 h

In der Tabelle ist der prozentuale Anteil an apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben, der beim Annexin-Test mit den aufgeführten Verbindungen festgestellt wurde. Die zugehörige Standardabweichung ist mit aufgelistet. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um Platinkomplexkonjugate.

Substanz	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]			Stabw.		
	apoptotisch	nekrotisch	vital	apoptotisch	nekrotisch	vital
Negativkontrolle	16,8	23,6	59,6	13,6	19,2	22,9
1	23,8	38,4	37,8	15,7	15,6	11,1
13a	22,4	34,0	42,6	17,1	19,6	20,8
13e	31,3	21,6	47,1	15,9	9,7	25,6
13i	13,2	63,7	23,1	1,8	2,7	0,8
13m	21,6	49,7	28,7	13,0	5,1	7,9
13n	6,3	10,4	83,3	4,2	5,9	7,4
14	11,5	47,4	41,2	0,6	2,7	2,2
15a	31,8	34,7	33,5	19,4	27,9	38,0
15c	36,6	19,9	43,6	24,3	6,9	30,4
15d	20,8	23,2	56,0	8,4	12,8	18,6
15e	22,6	25,6	51,6	8,6	12,7	14,8
15f	10,3	17,9	71,7	9,3	15,4	10,9
15g	19,4	20,5	60,2	6,5	19,0	23,3
15h	19,6	16,2	64,2	5,5	11,9	17,4
15i	32,4	22,5	45,2	18,0	9,3	9,8
15j	37,2	26,0	36,8	22,2	18,6	15,6
15l	36,6	19,1	44,3	7,4	8,3	5,7
15m	31,9	13,9	54,2	14,3	3,6	13,7
16d	13,8	61,6	24,6	1,2	8,6	9,7

Tabelle 3.25: Ergebnisse des Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 6 h

Für jede Substanz sind der Anteil an apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen und die jeweilige Standardabweichung aufgeführt. Alle Verbindungen in dieser Tabelle sind Derivate von Combretastatin A-4 **7a**.

Substanz	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]			Stabw.		
	apoptotisch	nekrotisch	vital	apoptotisch	nekrotisch	vital
Negativkontrolle	16,8	23,6	59,6	13,6	19,2	22,9
20	43,3	31,1	25,6	11,3	5,1	8,2
20a	9,0	5,7	85,3	5,9	4,2	10,0
21a	21,2	28,7	50,1	14,1	26,1	35,2
21b	9,4	31,2	59,4	4,6	25,8	29,3
21c	6,4	7,9	85,8	3,9	5,4	4,4
21d	11,1	7,2	81,7	7,2	4,7	4,3
22	11,2	63,8	25,0	1,9	10,9	9,0
23	23,0	21,2	55,9	12,1	13,3	25,3
26a	10,1	55,3	34,6	2,8	12,7	14,5
26b	19,8	64,4	15,8	1,3	4,1	4,2

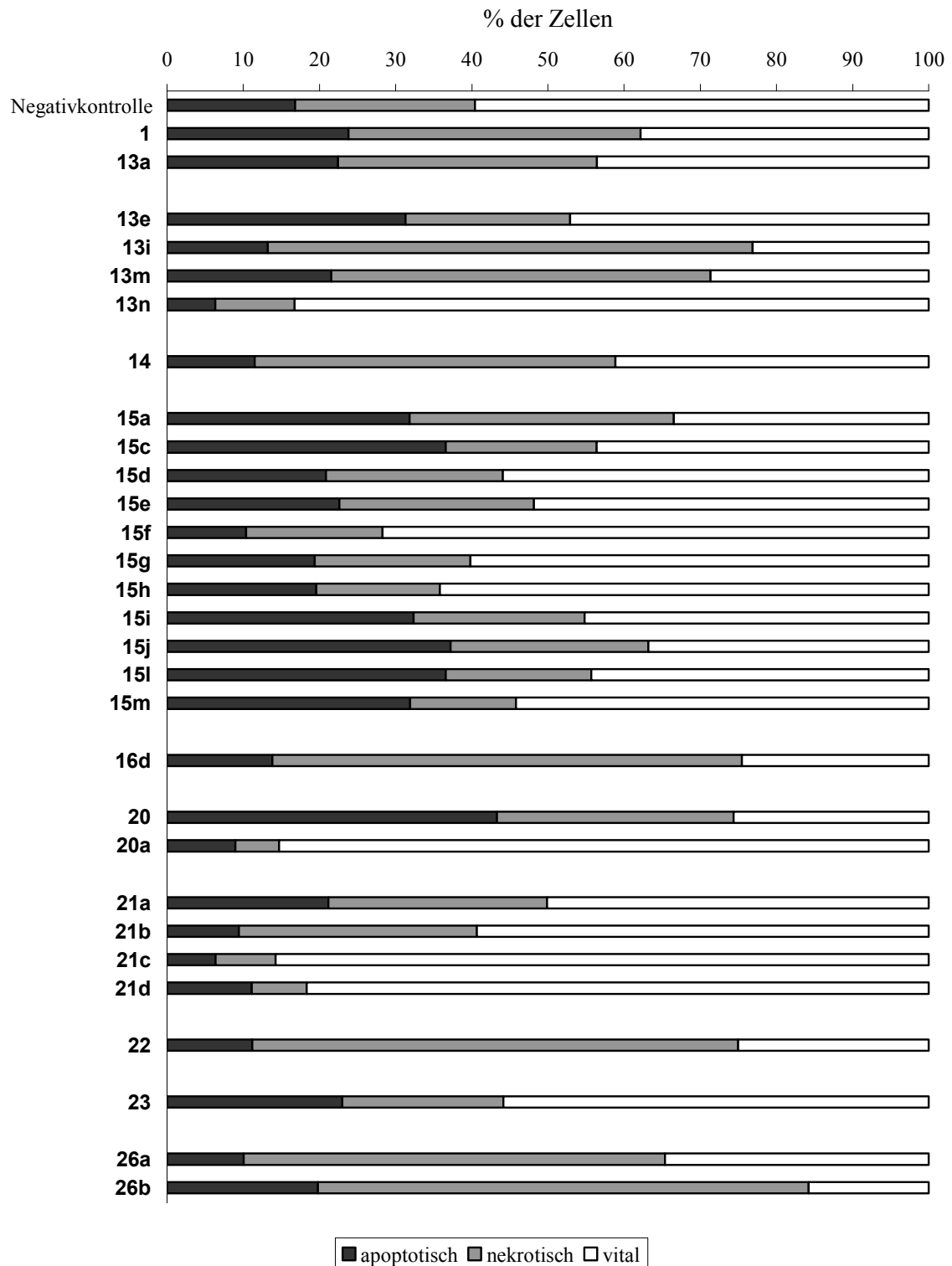


Abbildung 3.30: Der Annexin-Test mit einer Inkubationszeit von 6 h

Zu sehen sind die Ergebnisse aus Tab. 3.24 und 3.25 in Form eines Balkendiagramms. Die einzelnen Balken geben für jede Testverbindung den beim Annexin-Test ermittelten Anteil an apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen wieder. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf eine Darstellung der einzelnen Standardabweichungen verzichtet.

Um leichter festzustellen zu können, welche der getesteten Substanzen eher Apoptose als Nekrose auslöst, wurde anhand der ermittelten Daten und unter Vernachlässigung der vitalen Zellen das Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen bestimmt. Substanzen deren Wert größer als 1 ist, sind dabei als apoptoseauslösend anzusehen. In Tab. 3.26 und Abb. 3.31 sind die Ergebnisse dieser Berechnung dargestellt.

Tabelle 3.26: Ergebnisse des Annexin-Tests als Verhältnis

In der Tabelle ist für die mit dem Annexin-Test untersuchten Verbindungen das Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen angegeben. Die Werte wurden anhand der Daten aus Tab. 3.24 und 3.25 ermittelt.

Substanz	apoptotisch/nekrotisch	Substanz	apoptotisch/nekrotisch
Negativkontrolle	0,71	20	1,39
1	0,62	20a	1,57
13a	0,66		
		21a	0,74
13e	1,45	21b	0,30
13i	0,21	21c	0,80
13m	0,43	21d	1,55
13n	0,61		
		22	0,18
14	0,24		
		23	1,09
15a	0,92		
15c	1,84	26a	0,18
15d	0,90	26b	0,31
15e	0,88		
15f	0,58		
15g	0,95		
15h	1,21		
15i	1,44		
15j	1,43		
15l	1,92		
15m	2,29		
16d	0,22		

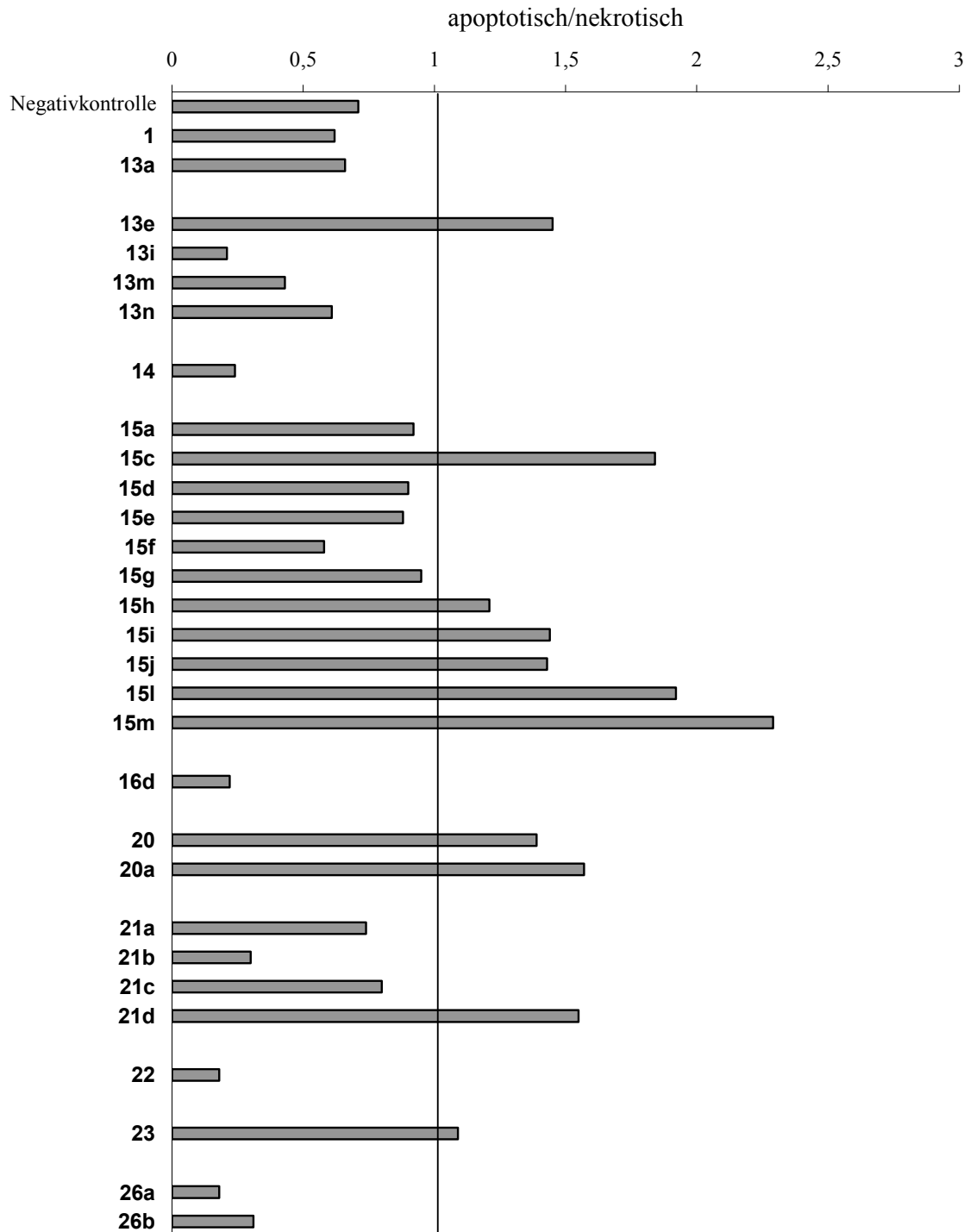


Abbildung 3.31: Der Annexin-Test als Darstellung des Verhältnisses

Die Verhältniswerte aus Tab. 3.26 sind hier als Balkendiagramm dargestellt. Zur Verdeutlichung wurde eine Linie in Höhe des Wertes 1 eingezeichnet. Substanzen, deren Balken diese Linie überschreiten sind als apoptoseinduzierend einzustufen.

3.7.2 Abhängigkeit des Annexin-Tests von der Inkubationszeit

Einige Substanzen führten zu einer großen Zahl apoptotischer Zellen beim TUNEL- und nekrotischer Zellen beim Annexin-Test. Es wurde vermutet, dass diese Zellen spätapoptisch waren. Bei fortschreitender Apoptose kommt es zu einer Schädigung der Membran, wodurch Propidiumiodid ins Innere gelangen kann. Man kann die Zellen nun nicht mehr von nekrotischen unterscheiden. Um mehr Zellen in einem früheren Stadium zu untersuchen, wurden Annexin-Tests mit einer verkürzten Inkubationszeit von 4 h durchgeführt. Die Konzentration wurde hierbei dem IC₅₀ für 24 h angeglichen (siehe Tab. 3.27 und Abb. 3.32)

Tabelle 3.27: Ergebnisse des Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 4 h

Für die untersuchten Verbindungen ist der beim Annexin-Test mit einer Inkubationszeit von 4 h ermittelte Anteil an apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben.

Substanz	Anteil an der Gesamtzellzahl [%]			Stabw.		
	apoptotisch	nekrotisch	vital	apoptotisch	nekrotisch	vital
Negativkontrolle	7,3	10,4	82,4	9,1	11,2	20,2
1	17,8	17,1	65,2	16,5	12,5	28,2
13a	26,3	23,0	50,8	21,9	7,3	28,6
13o	4,9	11,5	83,6	4,5	7,6	12,1
14	7,8	9,6	82,6	7,6	2,9	9,6
15a	39,4	41,3	19,3	10,4	8,5	4,7
15b	4,3	7,9	87,8	4,0	2,5	6,6
15e	35,9	39,1	25,0	6,0	9,6	9,9
15f	34,9	40,6	24,5	9,2	2,5	7,7
21b	15,5	14,9	69,5	12,3	9,3	16,7
26a	14,6	21,5	64,0	13,8	17,6	18,5
26b	13,0	11,7	75,3	6,6	5,5	11,0
27b	4,5	6,9	88,6	2,9	1,4	4,1
27e	4,3	6,7	89,0	2,0	8,3	9,6
27f	5,7	5,3	89,0	1,1	0,5	1,4
27g	7,0	3,9	89,1	4,4	2,3	5,7
27i	4,3	4,6	91,1	1,9	2,0	2,3

Ergebnisse

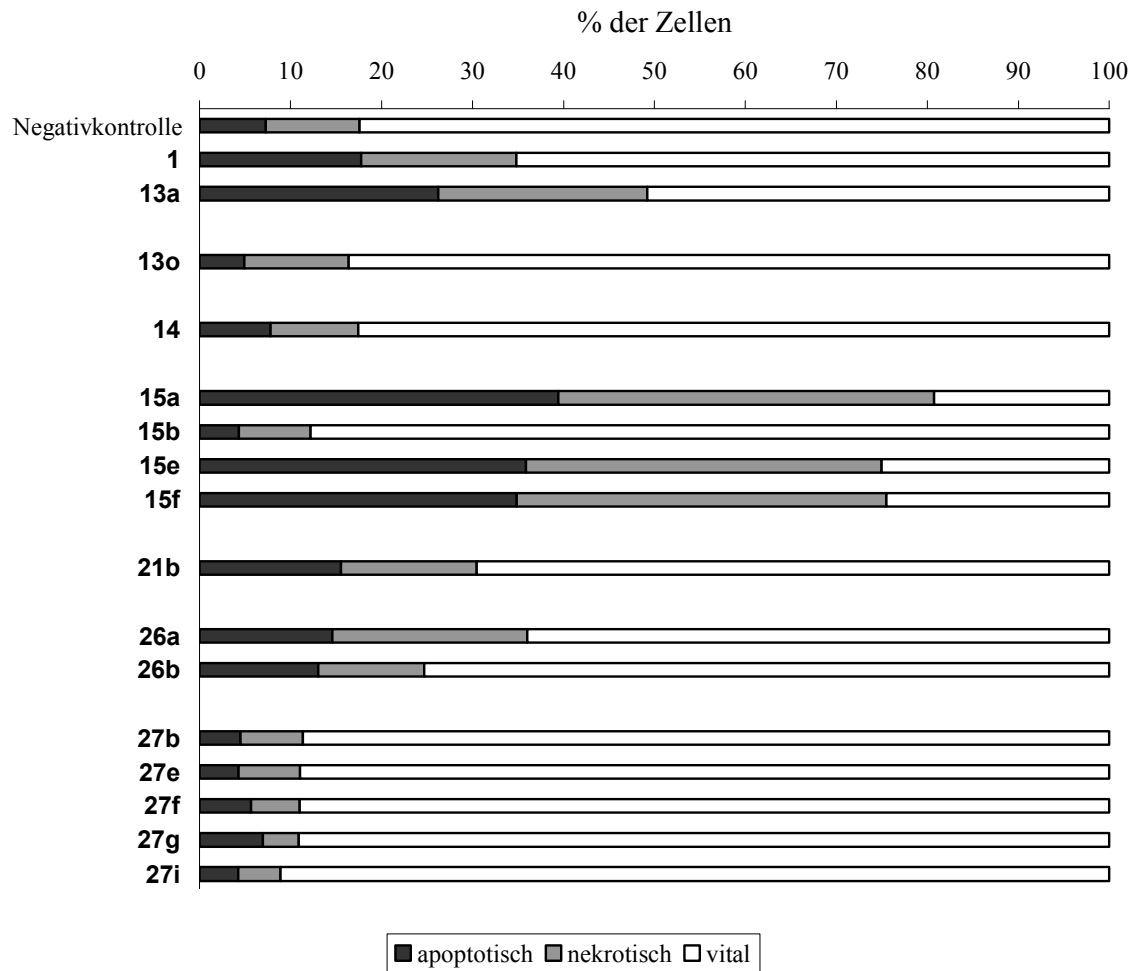


Abbildung 3.32: Ergebnisse des Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 4 h

Die Ergebnisse aus Tab. 3.27 sind hier als Balkendiagramm dargestellt.

Zur Veranschaulichung wurde auch hier das Verhältnis von apoptotischen Zellen zu nekrotischen Zellen bestimmt (siehe Tab. 3.28 und Abb. 3.33).

Tabelle 3.28: Ergebnisse des Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 4 h als Verhältnis

Für jede Substanz ist das berechnete Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen angegeben (vgl. Tab. 3.27).

Substanz	apoptotisch/nekrotisch
Negativkontrolle	0,70
1	1,04
13a	1,14
13o	0,43
14	0,81
15a	0,95
15b	0,55
15e	0,92
15f	0,86
21b	1,04
26a	0,68
26b	1,12
27b	0,65
27e	0,64
27f	1,06
27g	1,77
27i	0,92

Ergebnisse

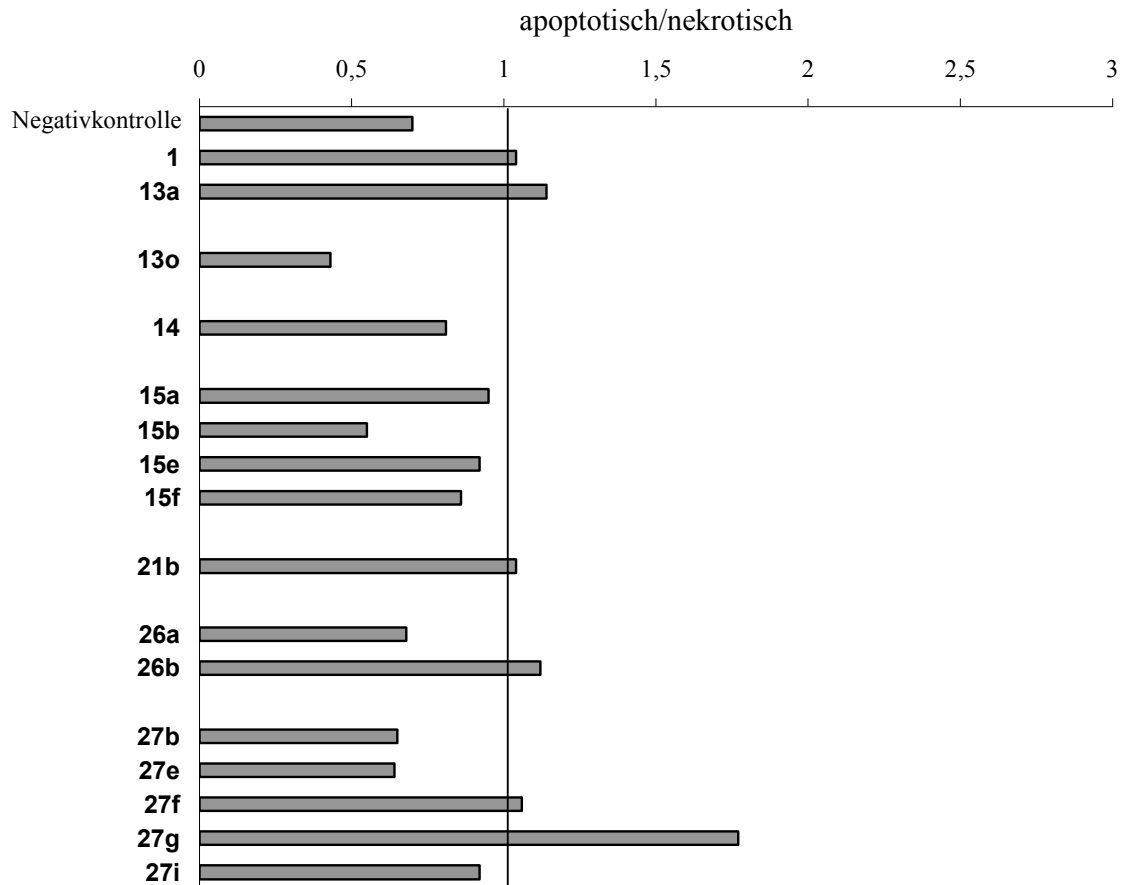


Abbildung 3.33: Ergebnisse des Annexin-Tests als Darstellung des Verhältnisses

In der Abbildung sind die Ergebnisse aus Tab. 3.28 als Balkendiagramm aufgeführt.

Die Resultate der Annexin-Tests mit unterschiedlicher Einwirkzeit (siehe Tab. 3.26 und 3.28) wurden miteinander verglichen (siehe Abb. 3.34). In parallelen Tests wurden zudem noch weitere Inkubationszeiten ausprobiert (Abb. 3.35).

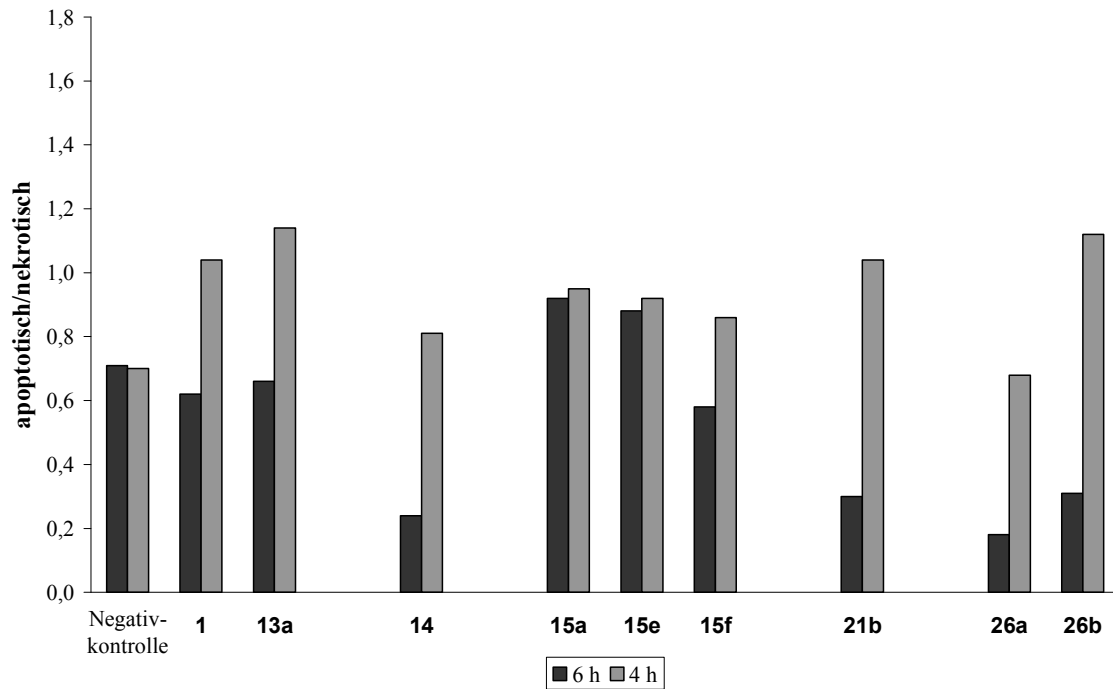


Abbildung 3.34: Vergleich der Ergebnisse des Annexin-Tests

Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der Annexin-Tests mit einer Inkubationszeit von 4 h und 6 h im Vergleich. Als Maß dient das Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen (vgl. Tab. 3.26 und 3.28).

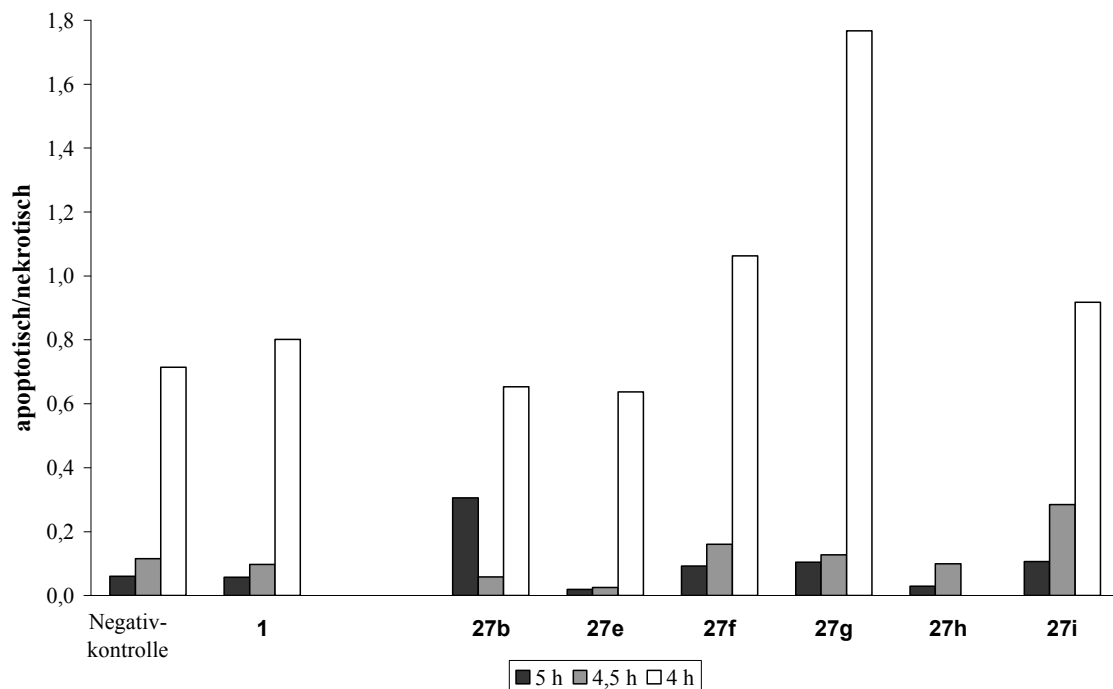


Abbildung 3.35: Ergebnisse des Annexin-Tests mit verschiedenen Inkubationszeiten

Dargestellt ist das Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen bei Tests mit 4, 4,5 und 5 h Inkubation.

Ergebnisse

Bei allen Substanzen konnte man bei einer Reduzierung der Inkubationszeit eine Erhöhung des relativen Anteils apoptotischer Zellen feststellen.

3.7.3 Der Annexin-Test an den 518 A2-Zellen

Nach der Etablierung des Annexin-Tests für Suspensionszellen wurde versucht, diese Untersuchungsmethode auch auf adhärente Krebszellen zu übertragen. Hierbei wurden mehrere Strategien verfolgt. Als Modellorganismus dienten dabei immer die Melanomzellen 518 A2.

3.7.3.1 Vorsichtiges Trypsinieren der Zellen

Laut Lai et al. sollte es möglich sein, den Annexin-Test mit adhärenenten Zellen durchzuführen, indem man diese durch kurzzeitiges Trypsinieren ablöst und danach wie Suspensionskulturzellen behandelt.^[151] Dies wurde wie in 2.10.2.1 beschrieben durchgeführt. Abb. 3.36 zeigt, was bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Zellen beobachtet werden konnte.

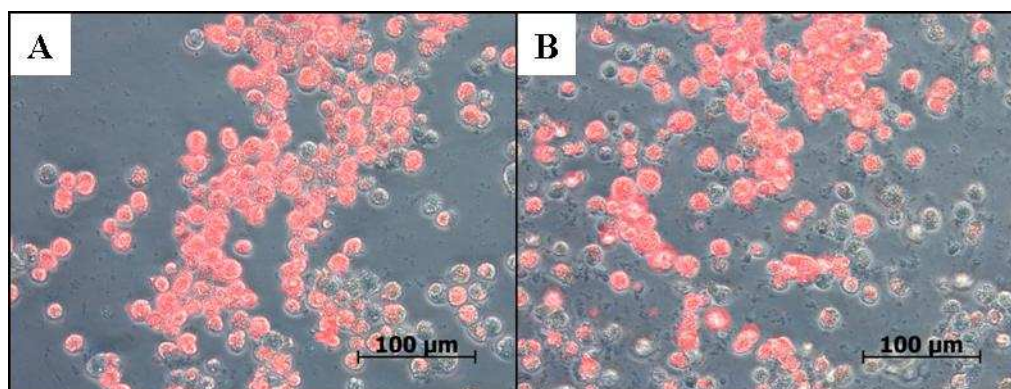


Abbildung 3.36: Der Annexin-Test mit trypsinisierten Zellen

Die Abbildung zeigt mikroskopische Aufnahmen von 518 A2-Zellen, mit denen der Annexin-Test wie von Lai et al. beschrieben durchgeführt worden ist. Die Zellen in Teilbild A waren mit PBS, die in Teilbild B mit **13a** inkubiert worden. Aus Gründen der Anschaulichkeit sind nur das Hellfeldbild und das Bild des roten Fluoreszenzkanals übereinandergelegt.

Der größte Teil der Zellen weist, unabhängig von der eingesetzten Substanz, eine extrem starke Rotfluoreszenz auf. Diese ist offensichtlich auf das Trypsin-EDTA zurückzuführen. Diese Methode ist also ungeeignet zur Untersuchung adhärenter Zellen.

3.7.3.2 Verwendung collagenbeschichteter Objektträger

Es wurde auch versucht, den Test mit Zellen durchzuführen, die noch auf dem Untergrund haften. Diese wurden dazu auf einem Trägermedium gezüchtet, das eine Behandlung mit dem Testkit und die anschließende fluoreszenzmikroskopische Betrachtung ermöglichen sollte. Mit Collagen beschichtete Objektträger stellten hierbei das erste untersuchte Substrat dar (siehe 2.10.2.2). In Abb. 3.37 ist dokumentiert, was bei dem Test beobachtet werden konnte.

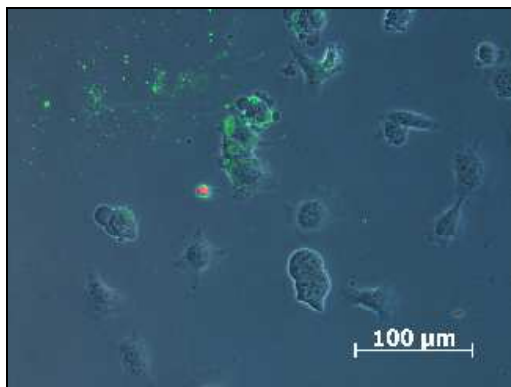


Abbildung 3.37: Der Annexin-Test unter Verwendung collagenbeschichteter Objektträger

In der Abbildung erkennt man 518 A2-Zellen, an denen der Annexin-Test durchgeführt worden war. Aufzucht und Test erfolgten dabei auf einem collagenbeschichteten Objektträger. Das Bild entstand aus der Überlagerung einer Hellfeldaufnahme sowie einer grünen und roten Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs.

Auch dieses Verfahren ist ungeeignet, da das markierte Annexin auch an Stellen haften bleibt, an denen sich keine Zellen befinden.

3.7.3.3 Verwendung von Chamber-Slides und Mikrotiterplatten

Da die Verwendung collagenbeschichteter Objektträger nicht zu einem verwertbaren Ergebnis führte, wurden Chamber Slides verwendet. Auf diesen erfolgten die Kultivierung der Zellen, ihre Inkubation mit der Testsubstanz und der eigentliche Annexin-Test (siehe 2.10.2.3). Im Vorfeld des Tests wurde das Wachstum der Zellen mikroskopisch verfolgt (siehe Abb. 3.38).

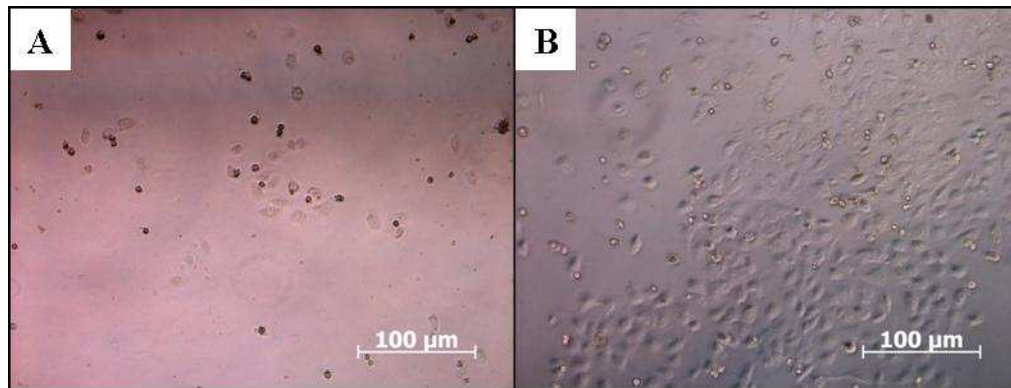


Abbildung 3.38: Wachstum von 518 A2-Zellen in Chamber Slides

Zu sehen sind mikroskopische Aufnahmen von zwei Kammern, in denen die Aufzucht der 518 A2-Zellen erfolgte. Die Bilder waren 24 h nach der Aussaat aufgenommen worden. Die Zellen in Teilbild A haben sich nicht am Boden der Kammer festgesetzt. Die in Teilbild B sind zwar größtenteils angewachsen, jedoch befinden sich auch hier noch viele Zellen in Suspension.

Trotz identischer Zellzahl bei der Animpfung beider Kammern, sind die Zellen sehr unregelmäßig angewachsen. Der Annexin-Test wurde dennoch durchgeführt, allerdings nur unter Verwendung von Kammern, deren Zellen dafür auch geeignet waren (siehe Abb. 3.39).

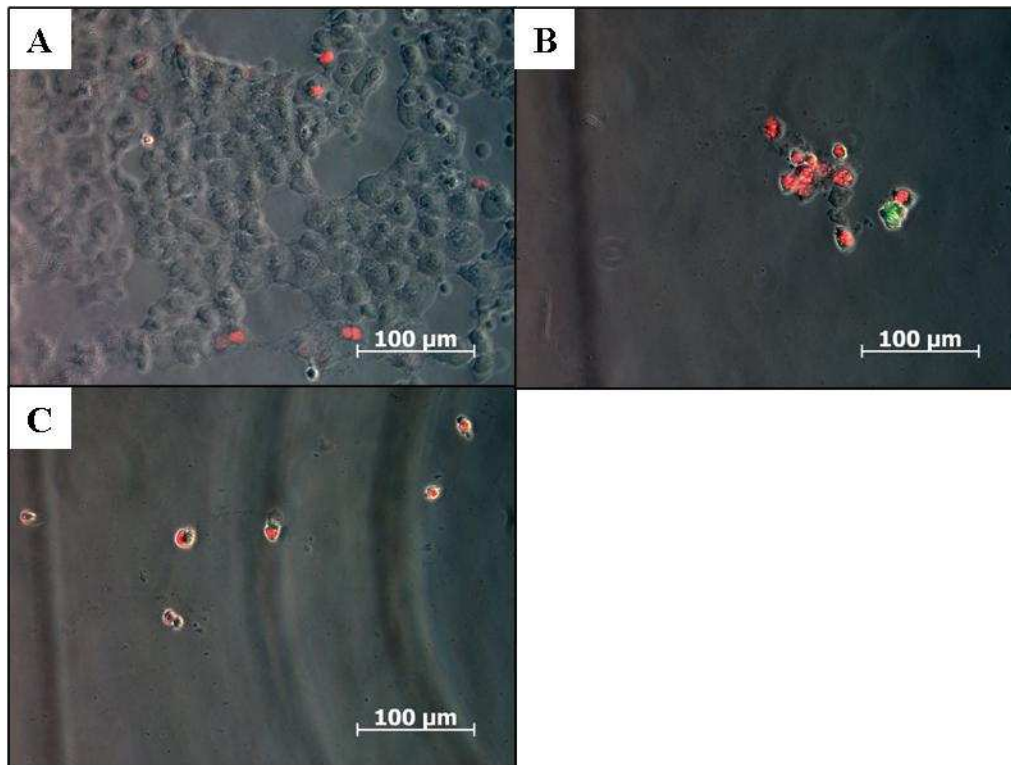


Abbildung 3.39: Der Annexin-Test unter Verwendung von Chamber Slides

Die Abbildung zeigt mikroskopische Aufnahmen von 518 A2-Zellen in Chamber Slides, mit denen der Annexin-Test durchgeführt worden ist. Die Zellen in Teilbild A waren mit PBS, die in Teilbild B mit 10 μM **1** und die in Teilbild C mit 10 μM **13a** behandelt worden. Die Inkubationszeit betrug 6 h. Alle diese Bilder entstanden aus der Überlagerung einer Hellfeldaufnahme sowie einer grünen und einer roten Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs.

Der größte Teil der Zellen, die mit den Positivkontrollen behandelt worden waren, hatte sich infolge der Inkubation vom Boden gelöst. Bei weiteren Versuchen wurden deshalb sowohl die Zellen auf dem Trägermedium als auch die im Überstand untersucht (siehe Abb. 3.40). Hierbei wurden 24-Well Mikrotiterplatten verwendet, bei denen keine Probleme hinsichtlich des Anwachsens der Zellen auftraten. Die Inkubationszeit betrug anfangs 6 h.

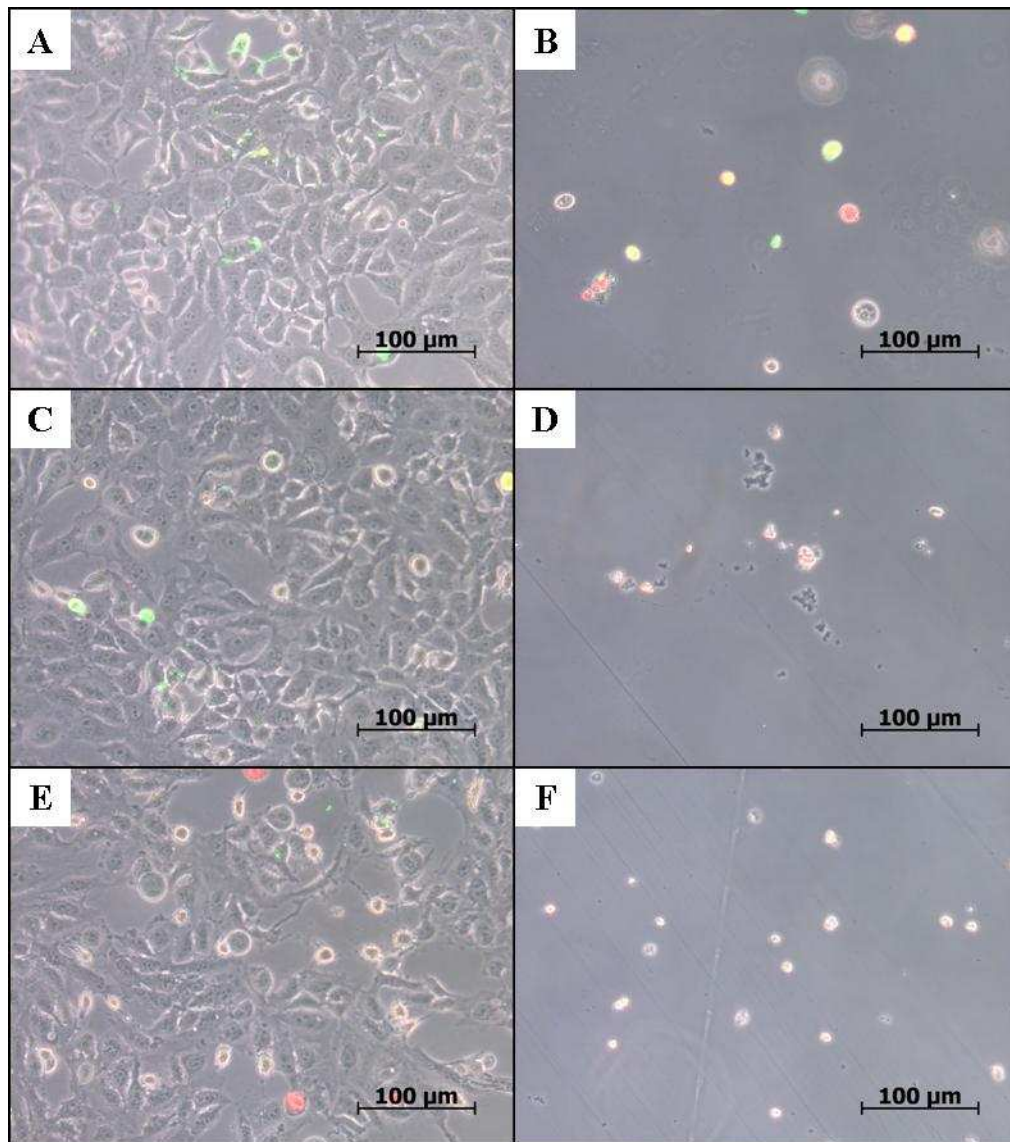


Abbildung 3.40: Der Annexin-Test unter Verwendung von 24-Well Mikrotiterplatten

In den Teilbildern sind 518 A2-Zellen zu sehen, an denen der Annexin-Test vorgenommen worden war. Die Teilbilder A, C und E zeigen die Zellen am Boden der Wells, die Teilbilder B, D und F die Zellen im Überstand. Die Zellen waren vorher für 6 h mit PBS (A und B), 10 µM **1** (C und D) sowie 10 µM **13a** (E und F) behandelt worden. Die Teilbilder entstanden aus der Übereinanderlegung einer Hellfeldaufnahme, sowie je einer Aufnahme im grünen und im roten Fluoreszenzbereich.

Die Zahl der Zellen im Überstand ist deutlich geringer als die am Boden, weshalb man keine verlässliche Aussage über ihr Verhältnis zueinander treffen kann. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 16 h (siehe Abb. 3.41) führte zu keiner Veränderung. Zwar befanden sich hierbei nach der Behandlung mit **13a** keinerlei Zellen mehr am Boden, aber im Überstand blieb die Zahl unverändert gering. Dies zeigt, dass die Lebensdauer der Zellen nach dem

Ablösen äußerst kurz sein muss und deshalb Aussagen hinsichtlich des Verhältnisses von apoptotischen zu nekrotischen Zellen so gut wie unmöglich sind.

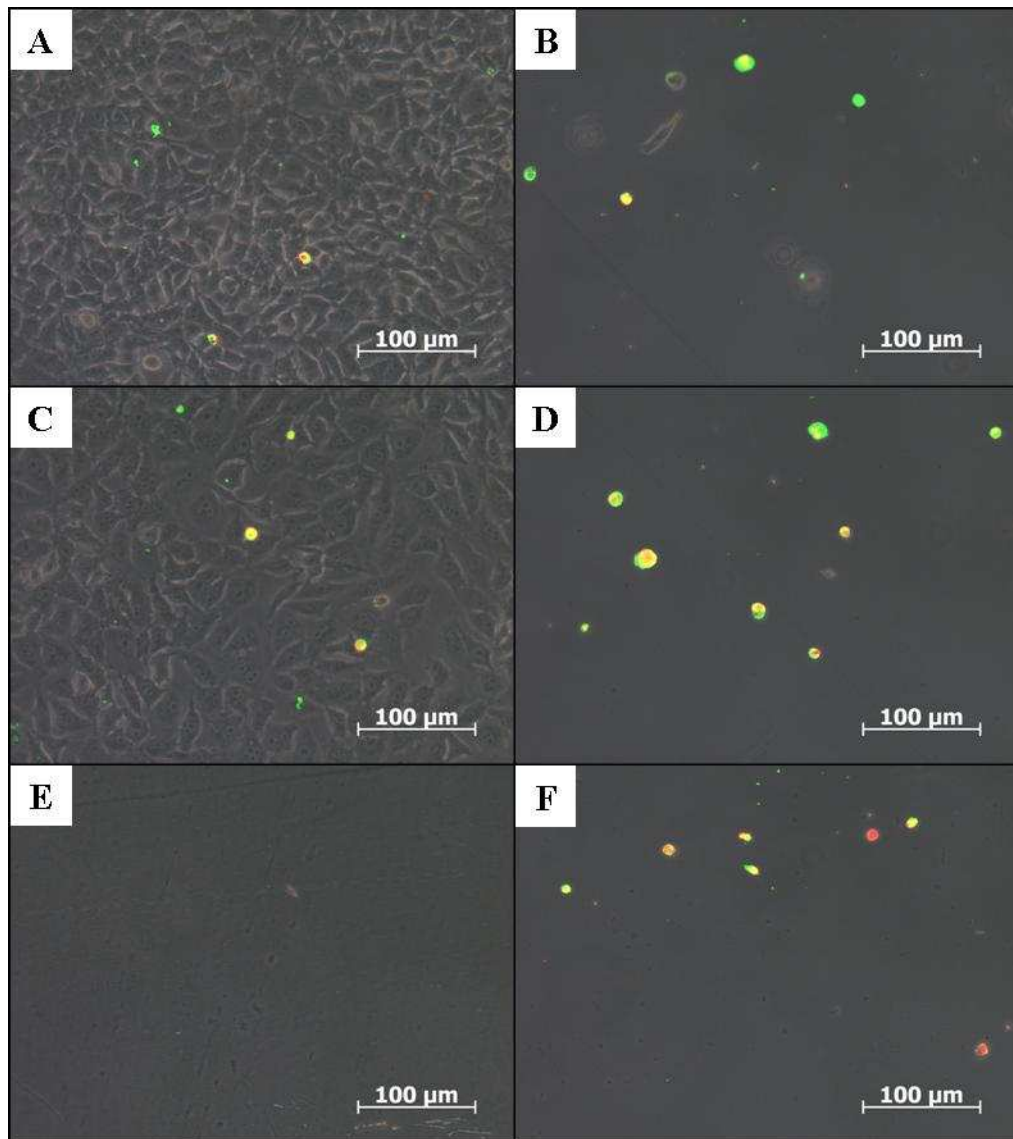


Abbildung 3.41: Der Annexin-Test unter Verwendung von 24-Well Mikrotiterplatten

Analog zu Abb. 3.40 sind hier mikroskopische Aufnahmen von 518 A2-Zellen dargestellt, an denen der Annexin-Test durchgeführt worden ist. Die Inkubation erfolgte mit PBS (A und B), **1** (C und D) und **13a** (E und F), die Inkubationszeit betrug 16 h. Teilbild A, C und E zeigen die Zellen am Boden, Teilbild B, D und F die Zellen im Überstand. Die Teilbilder sind Überlagerungen einer Hellfeldaufnahme, einer grünen und einer roten Fluoreszenzaufnahme. Bei Teilbild E wurde auf Fluoreszenzaufnahmen verzichtet.

3.8 Immunoblot

Die Caspase 9 ist ein wichtiges regulatorisches Protein beim mitochondrialen Weg der Apoptoseinitiierung. Um festzustellen, ob und wann es aktiviert wird, wenn man Zellen mit einer Testsubstanz inkubiert, wurden Immunoblots durchgeführt. Dazu wurde das Protein von behandelten Zellen isoliert, per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach erfolgte der Nachweis der aktiven und der inaktiven Form der Caspase 9 mittels spezifischer Antikörper. So war eine Beobachtung der Aktivierungskinetik möglich (siehe 2.11).

3.8.1 Methodenentwicklung

3.8.1.1 Bestimmung der optimalen PAGE-Bedingungen

Zur Bestimmung der am Besten geeigneten Gelstärke wurden PAGEs mit 7,5%igen und 12%igen Gelen durchgeführt (siehe 2.11.2 und 2.11.3). Es wurden hierbei 60 und 70 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Dieses war aus unbehandelten HL 60-Zellen gewonnen worden (siehe 2.11.1). Gele und davon erstellte Blots wurden gefärbt (siehe 2.11.4 und 2.11.6) um die Banden aller Proteine sichtbar zu machen (siehe Abb. 3.42). Da die Bilder nur eine qualitative Aussage liefern sollten, wurde auf die Verwendung von Proteinstandards verzichtet.

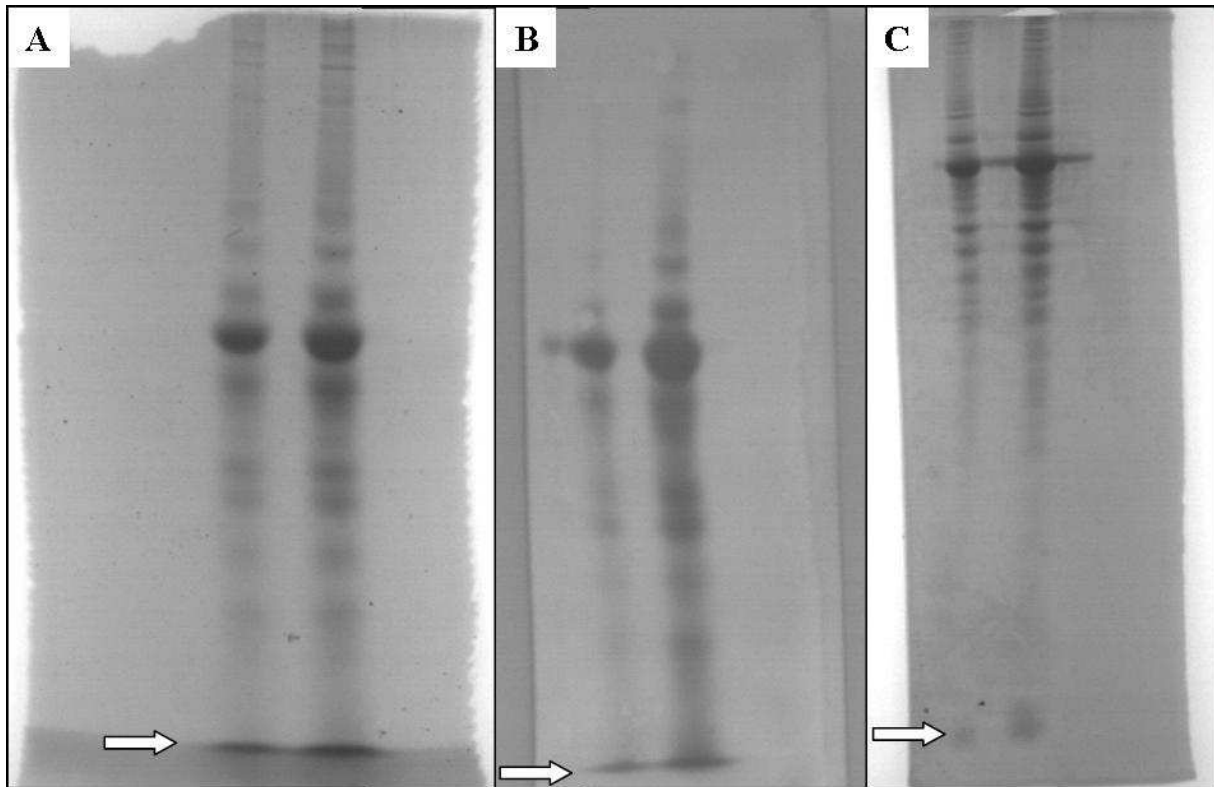


Abbildung 3.42: Ermittlung der Rahmenbedingungen für PAGE und Western-Blot

Teilbild A zeigt ein gefärbtes PAGE-Gel mit einer Stärke von 7,5%, Teilbild B einen gefärbten Blot. Das Gel, aus dem der Blot erstellt wurde, entstand unter den gleichen Bedingungen wie das Gel in Teilbild A. In Teilbild C ist ein PAGE-Gel mit einer Stärke von 12% nach der Färbung zu sehen. Auf die Durchführung eines Western Blots wurde hierbei verzichtet, da der Vergleich von Teilbild A und B keine gravierenden Unterschiede ergab. Aufgetragen wurden jeweils 60 μg Protein in der linken und 70 μg in der rechten Bahn. Proteine, die auf Höhe der Lauffront wandern, sind mit weißen Pfeilen markiert.

Eine Gelstärke von 12% erwies sich als optimal. Auch wenn Abb. 3.42 nahelegt, dass eine Proteinmenge von 60 μg ausreichen müsste, wurden 70 μg verwendet, da man bei der Immunodetektion sonst ein zu schwaches Signal erhält (vgl. Abb. 3.43). Die in der Literatur angegebene Transferzeit für den Western Blot von 60 min musste für ein optimales Ergebnis um 15 min verlängert werden (siehe 2.11.5).

3.8.1.2 Bestimmung der optimalen Bedingungen zur Immunodetektion

Der sekundäre Antikörper konnte in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:10.000 verwendet werden, die optimale Konzentration des primären musste erst bestimmt werden. Zu Beginn der Untersuchungen war eine Probenpackung verwendet worden, die auch in einer Verdünnung von 1:10.000 eine deutlich sichtbare Markierung der Caspase 9 ermöglichte. Dies galt jedoch nicht für die später käuflich erworbene Charge des Antikörpers (siehe Abb. 3.43). Hier konnte erst bei einer Verdünnung von 1:1000 ein verwertbares Ergebnis erzielt werden (siehe Abb. 3.44). Es war das Protein von HL 60-Zellen untersucht worden, die infolge eines zu langen Wachstums auf natürlichem Weg abstarben.

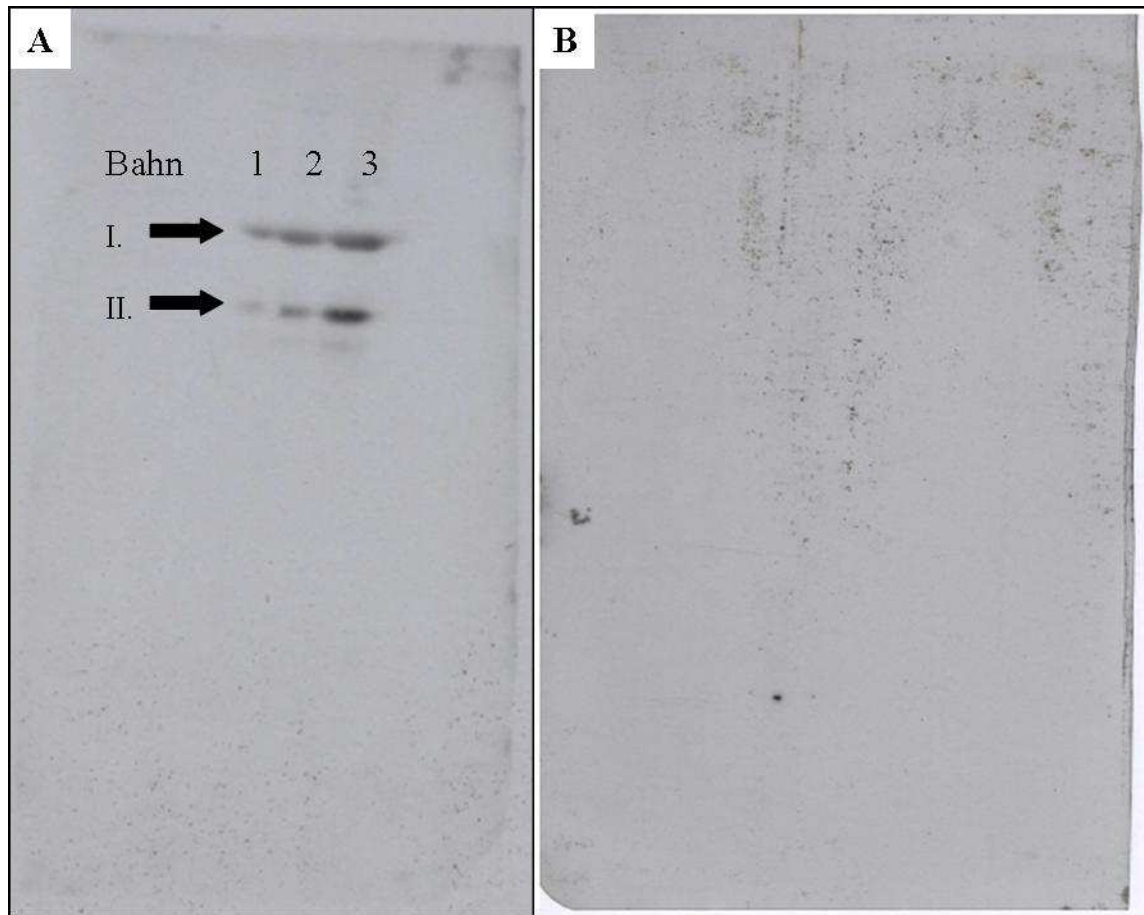


Abbildung 3.43: Immunoblot zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration und Proteinmenge

In der Abbildung sind zwei Immunoblots dargestellt. Zur Markierung der Caspase 9 waren bei dem Blot in Teilbild A die als Probenpackung erhaltenen Primärantikörper verwendet worden. In Teilbild B erfolgte die Immunoreaktion mit den käuflich erworbenen. Beide Chargen waren 1:10.000 verdünnt worden. In Bahn 1 betrug die Proteinmenge 40 µg, in Bahn 2 60 µg und in Bahn 3 70 µg. Die Banden der aktiven Caspase 9 (II.) und die der inaktiven Procaspase (I.) sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Zur Demonstration der Spezifität der Antikörper ist der gesamte Blot dargestellt.

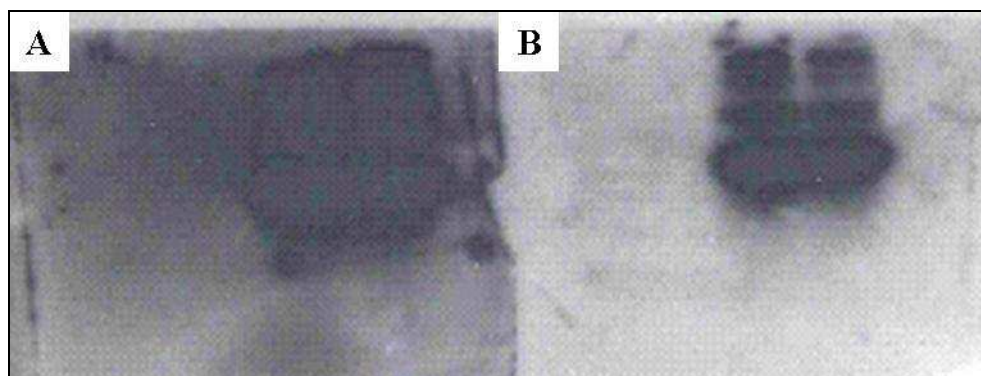


Abbildung 3.44: Immunoblot zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration

In der Abbildung sind zwei Immunoblots zu sehen, bei deren Erstellung die käuflich erworbenen Primärantikörper verwendet wurden. Deren Verdünnung lag in Teilbild A bei 1:100 und in Teilbild B bei 1:1.000. Um ein möglichst deutliches Signal zu erhalten, betrug die Proteinmenge jeweils 100 µg pro Bahn. Es wurden je zwei identische Bahnen aufgetragen.

3.8.2 Untersuchung der Caspase 9-Aktivierung mittels Immunoblot

3.8.2.1 Untersuchungen an HL 60-Zellen

Nach der Optimierung der Versuchsparameter, wurden einige der am Lehrstuhl hergestellten Verbindungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivierung der Caspase 9 untersucht. Die Bedingungen bei Inkubation und Probennahme wurde dabei an die jeweilige Verbindung angepasst. Dies soll am Beispiel der Terpen-Platinkomplexkonjugate **13a** und **13k** demonstriert werden (siehe Abb. 3.45 und 3.46).

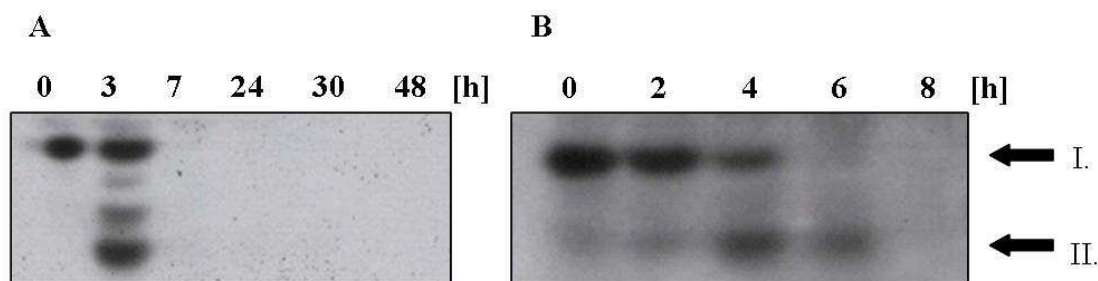


Abbildung 3.45: Immunoblots von mit **13a inkubierten HL 60-Zellen**

Die Teilbilder A und B zeigen Immunoblots von Zellen, die mit **13a** inkubiert worden sind. Die Banden der Procaspase 9 (I.) und der Caspase 9 (II.) sind mit schwarzen Pfeilen markiert. Die Substanzkonzentration entsprach dem IC₅₀ für 24 h (7 µM).

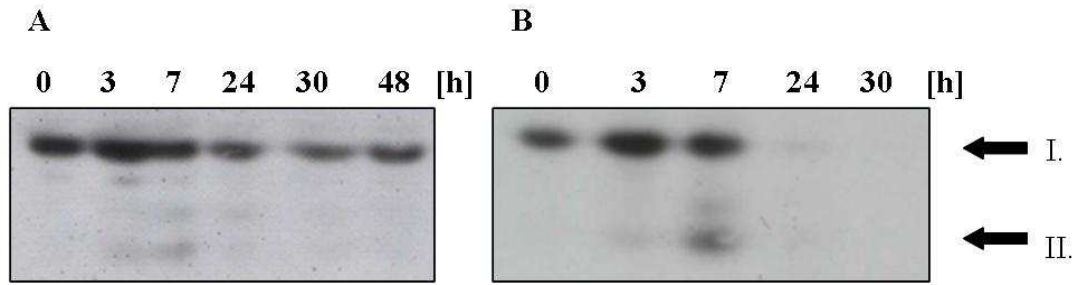


Abbildung 3.46: Immunoblots mit HL 60-Zellen inkubiert mit 13k

Die in der Abbildung dargestellten Immunblots stammen von Zellen, die mit dem Isolongifolol-Platinkomplexkonjugat **13k** behandelt worden sind. Bei Teilbild A betrug die Endkonzentration der Testsubstanz im Ansatz 10 µM, bei Teilbild B 29 µM, entsprach also dem IC_{50} -Wert für 24 h. In beiden Teilbildern markieren schwarze Pfeile die Banden der inaktiven (I.) und der aktiven Form (II.).

Bei einer Konzentration, die unter dem entsprechenden IC_{50} -Wert liegt, läuft die Apoptoseinitiierung nur unvollständig ab. Dies erkennt man daran, dass selbst zum Ende der Inkubationszeit noch eine große Menge der Procaspase nachweisbar ist. Bei den weiteren Untersuchungen entsprach die eingesetzte Substanzkonzentration deshalb immer dem IC_{50} für 24 h. Die Betrachtung der Kinetik erfolgte zuerst über eine Zeitspanne von 30 bis 48 h und wurde, wenn nötig, analog zu **13a** angepasst. In Abb. 3.47 bis 3.49 sind die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen an den HL 60-Zellen dargestellt. Als Negativkontrolle fungierten Zellen, die mit PBS behandelt worden waren.

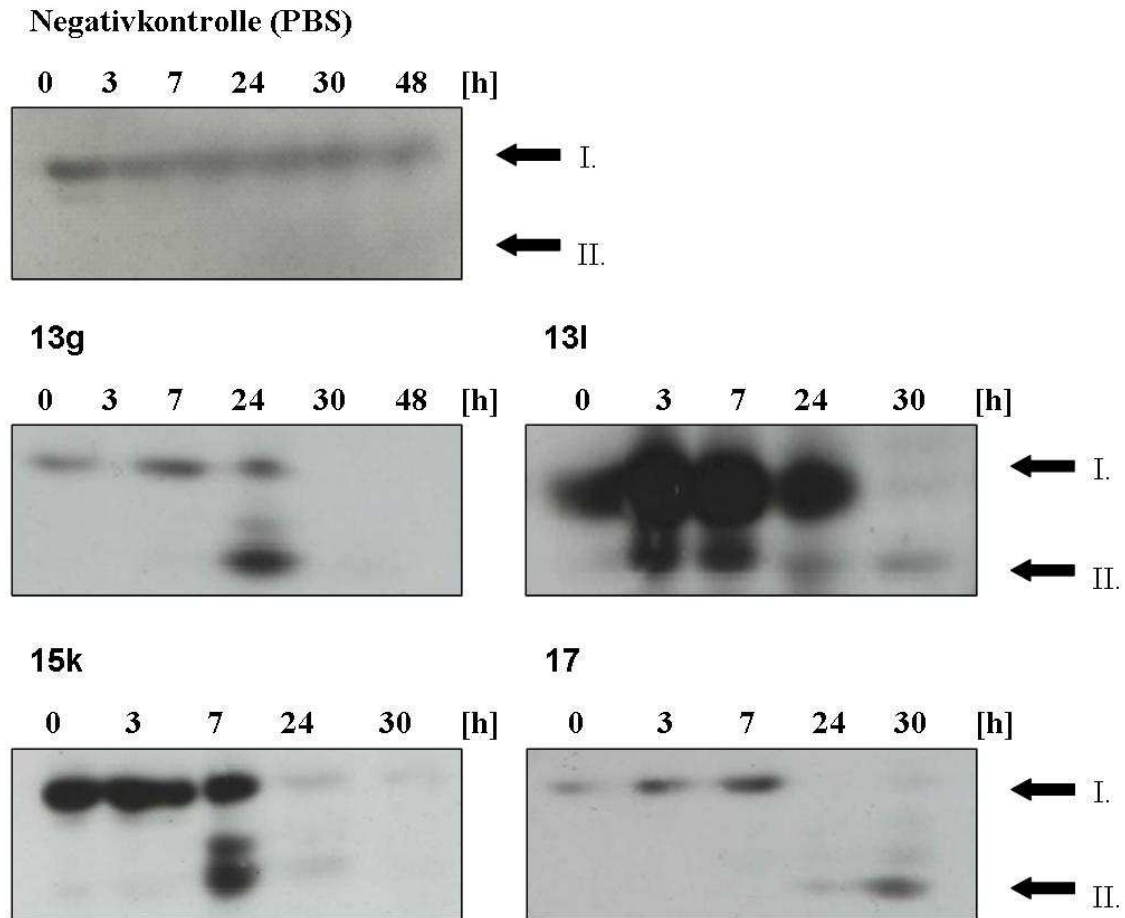


Abbildung 3.47: Immunoblots mit HL 60-Zellen

Die Teilbilder zeigen Immunblots von HL 60-Zellen, die mit den Terpen-Platinkomplexkonjugaten **13g**, **13l** und **15k** sowie dem Steroid-Lost **17** inkubiert worden waren. Daneben ist auch die Negativkontrolle mit aufgeführt. Zu sehen sind die Banden der inaktiven Procaspase 9 (I.) und der aktiven Caspase 9 (II.). Die jeweilige Substanzkonzentrationen betrug 7 μM für **13g**, 5 μM für **13l**, 15 μM für **15k** und 25 μM für **17**.

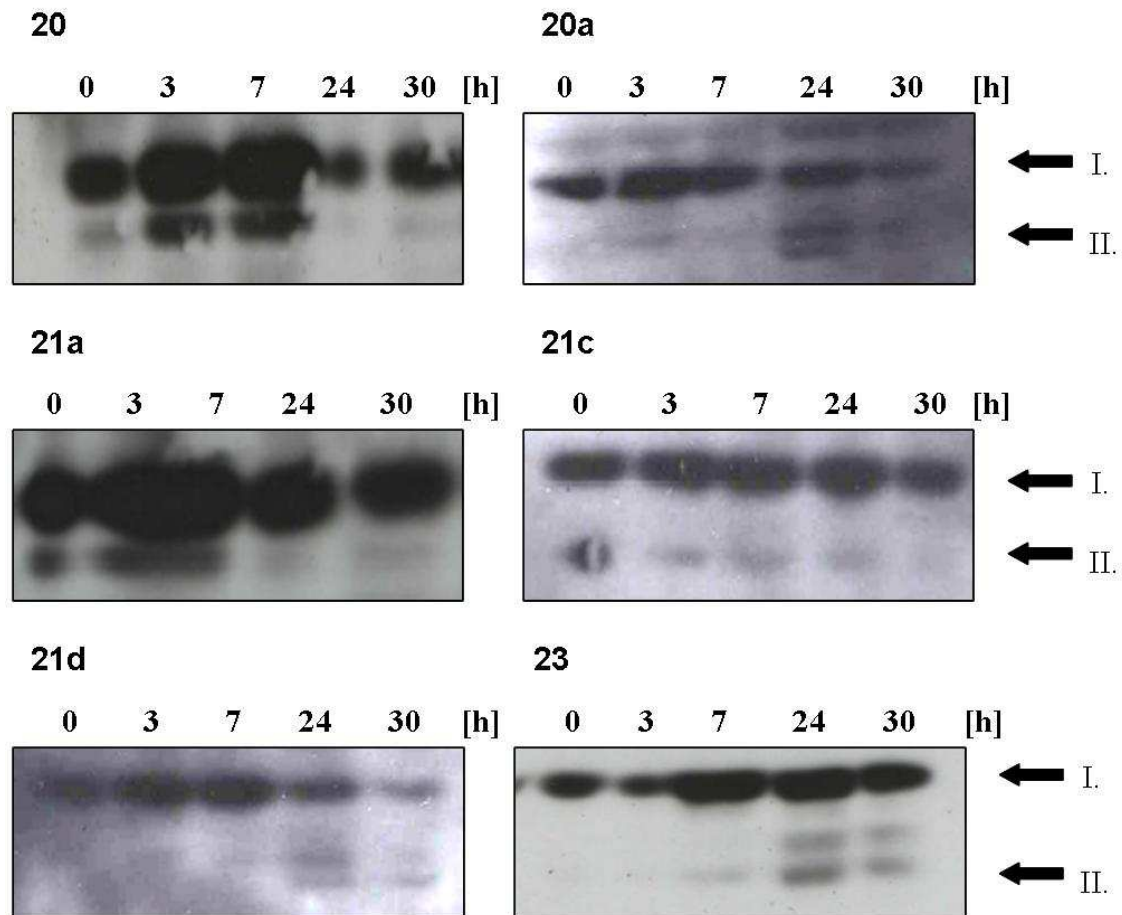


Abbildung 3.48: Immunoblots mit HL 60-Zellen

In der Abbildung sind Immunblots von HL 60-Zellen zu sehen, die mit verschiedenen Chalkonderivaten (**20**, **21** und **23**) behandelt worden waren. Pfeile zeigen die Banden der inaktiven (I.) und der aktiven Caspase 9 (II.) an. Die jeweilige Substanzkonzentration betrug 1,7 nM für **20**, 0,4 nM für **20a**, 0,6 nM für **21a**, 14,8 μ M für **21c**, 0,03 nM für **21d** (IC_{50} -Wert für 48 h), und 0,4 μ M für **23**.

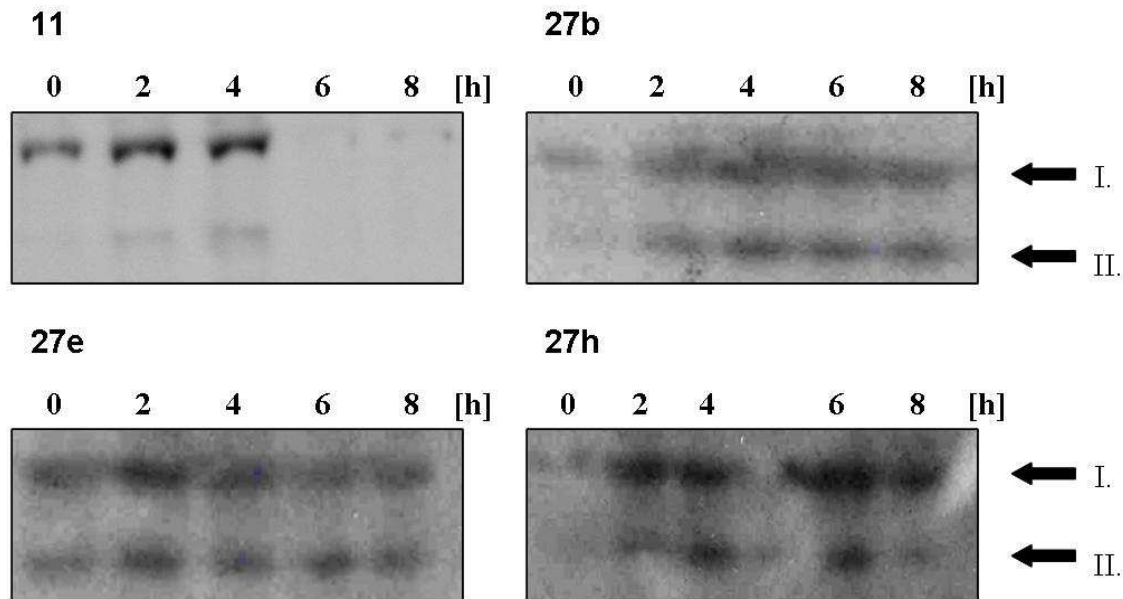


Abbildung 3.49: Immunoblots mit HL 60-Zellen

Die Immunblots in der Abbildung stammen von HL 60-Zellen, die mit verschiedenen Illudinderivarten **27** bzw. der Muttersubstanz Illudin M **11** inkubiert worden waren. Die Banden der Procaspase 9 (I.) und der Caspase 9 (II.) sind mit schwarzen Pfeile markiert. Die jeweilige Substanzkonzentration betrug 0,02 μM für **11**, 6,8 μM für **27b**, 2,5 μM für **27e** und 6,2 μM für **27h**.

3.8.2.2 Untersuchungen an 518 A2-Zellen

Neben den HL 60-Zellen wurden auch andere Zelllinien per Immunoblot untersucht, z.B. die Melanomzellen 518 A2 (siehe Abb. 3.50). Auf die Erstellung einer Negativkontrolle konnte hierbei verzichtet werden, da alle Zellen eines Durchlaufs zum selben Zeitpunkt ausgesät und geerntet wurden. Die Zellen mit einer Inkubationszeit von $t = 0$ h entsprachen also unbehandelten Zellen. Da für die einzelnen Untersuchungen mehr Zellen zur Verfügung standen als bei den HL 60, wurde ein zusätzlicher Messzeitpunkt während der ersten 4 h der Inkubation eingeführt.

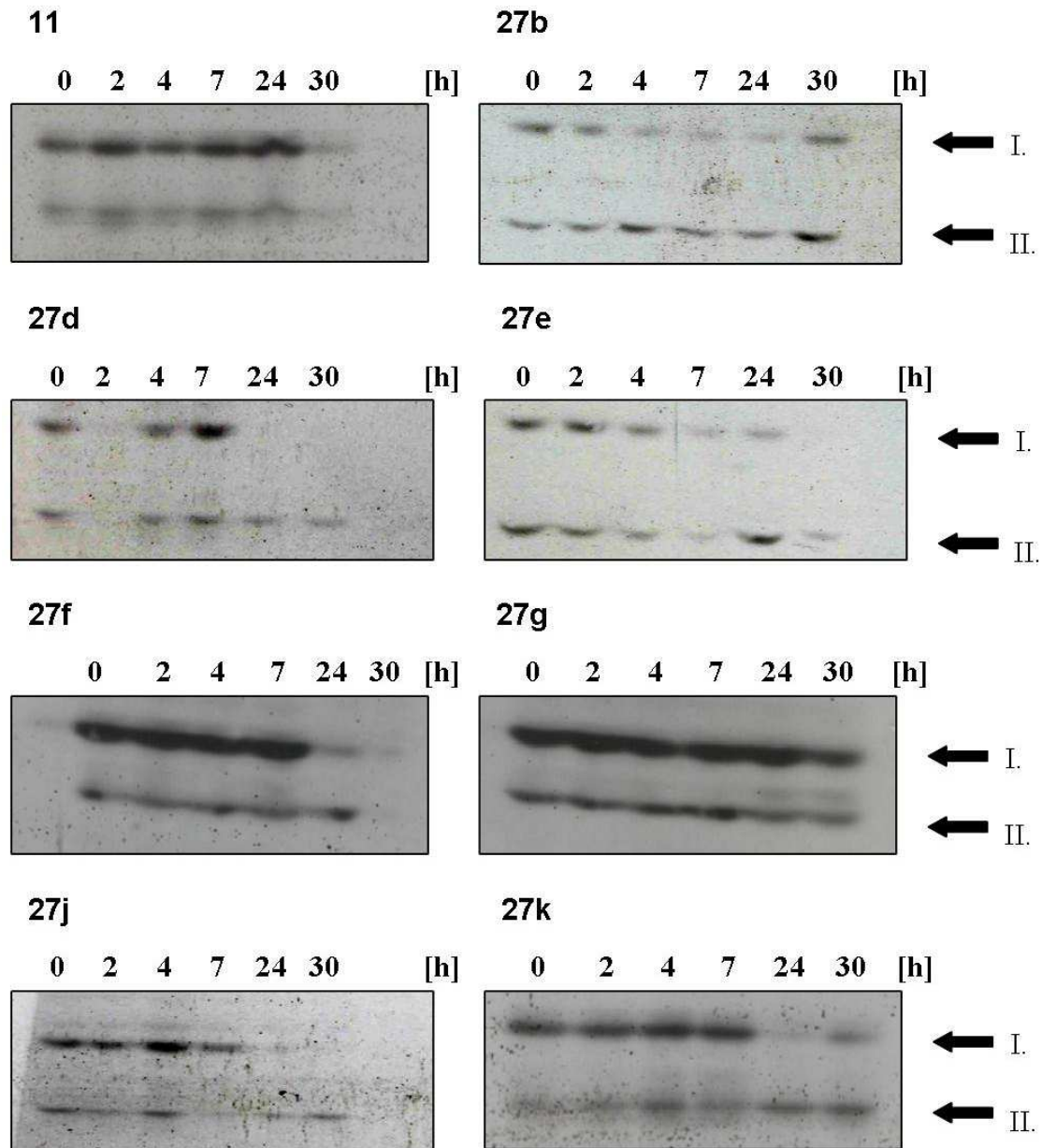


Abbildung 3.50: Immunoblots mit 518 A2-Zellen

Die Teilbilder zeigen Immunblots, die unter Verwendung von 518 A2-Zellen durchgeführt worden sind. Diese waren zuvor verschiedenen Illudinderivaten **27** sowie der Muttersubstanz **11** ausgesetzt worden. Analog zu Abb. 3.45 bis 3.49 sind die Banden der inaktiven (I.) und der aktiven (II.) Caspase 9 mit Pfeilen gekennzeichnet. Die jeweilige Substanzkonzentration betrug 0,03 μM für **11**, 5 μM für **27b**, 12 μM für **27d**, 3 μM für **27e**, 1 μM für **27f**, 3 μM für **27g**, 8 μM für **27j**, und 0,6 μM für **27k**.

3.8.2.3 Untersuchungen an Kb-V1-Zellen

Bei der immunologischen Untersuchung der Kb-V1-Zellen wurde wie bei den 518 A2-Zellen vorgegangen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.51 dargestellt.

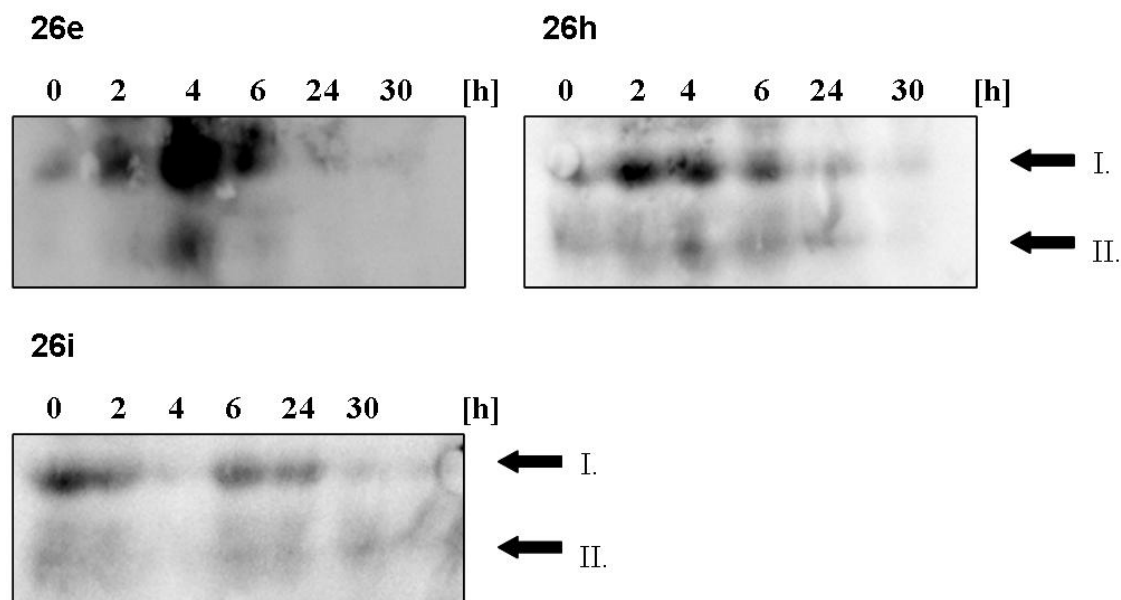


Abbildung 3.51: Immunoblots mit Kb-V1-Zellen

In der Abbildung sind Immunblots zu sehen, die unter Verwendung von Kb-V1-Zellen erstellt wurden. Die Zellen waren mit dem Oxazol **26e** bzw. mit den Imidazolen **26h** und **26i** behandelt worden. Die Procaspase 9 (I.) und die Caspase 9 (II.) sind mit Pfeilen markiert. Die jeweilige Substanzkonzentration betrug 0,4 μM für **26h** und 0,2 μM für **26i**. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung der exakte IC_{50} für **26e** noch nicht feststand, wurde eine Konzentration von 10 μM verwendet.

3.9 Der CAM-Assay

3.9.1 Vergleich verschiedener Aufzuchtmethoden

Mit dem CAM-Assay sollte der Einfluss von Testsubstanzen auf die Blutgefäßentwicklung untersucht werden. Als Modellsystem dienen dabei die Gefäße eines Hühnereis. Hierzu musste ein Verfahren gefunden werden, um die Hühnerembryonen so wachsen zu lassen, dass auch eine vergleichbare Dokumentation möglich ist. Nur die unter 2.12.1 beschriebene Aufzucht in mit Folie bespannten Kaffeebechern konnte dies gewährleisten (siehe Abb. 3.52).

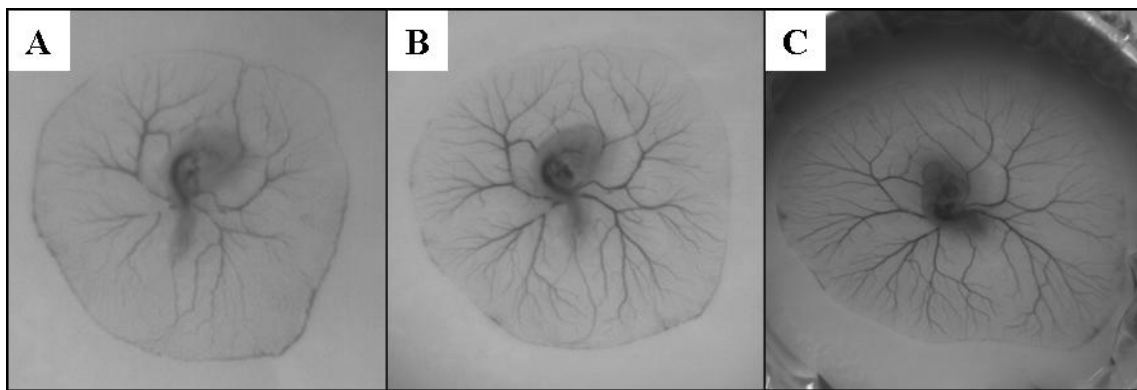


Abbildung 3.52: Aufzucht eines Hühnerembryos in einem modifizierten Kaffeebecher

Die Teilbilder zeigen Aufnahmen eines Hühnerembryos. Dieser war nach einem anfänglichen Wachstum im Ei wie unter 2.12.1 beschrieben in einen präparierten Kaffeebecher umgelagert worden. Dadurch wurde eine Dokumentation mittels Transilluminator möglich (siehe 2.12.4). Teilbild A zeigt den Embryo direkt nach der Überführung, Teilbild B 1 d und Teilbild C 3 d später.

Daneben waren weitere Methoden zur Aufzucht des Embryos außerhalb der Schale ausprobiert worden (siehe 2.12.2). Die Resultate werden im Folgenden näher beschrieben.

3.9.1.1 Petrischalen

Bei diesem Verfahren war der Inhalt eines Hühnereis in eine sterile Petrischale gegeben worden (siehe 2.12.2.1). Innerhalb der ersten 24 h nach der Überführung, konnte ein Wachstum des Embryos beobachtet werden, danach starb er ab (siehe Abb. 3.53).

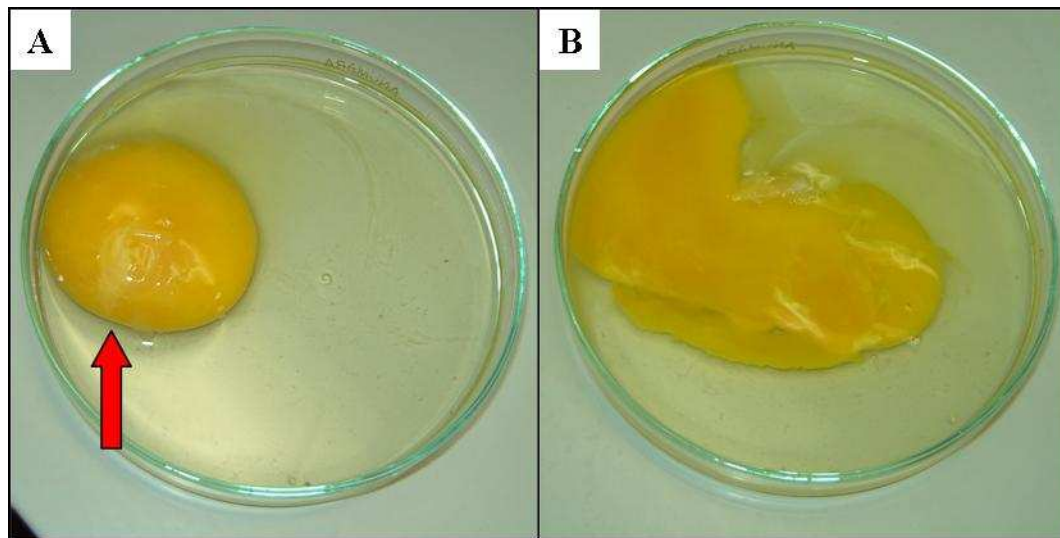


Abbildung 3.53: Versuch der Aufzucht eines Hühnerembryos in einer Petrischale

In Teilbild A sieht man die Aufnahme eines Hühnereis 24 h nach der Überführung in eine Petrischale. Der rote Pfeil markiert die Stelle, an der man bereits ansatzweise den Embryo erkennen kann. Teilbild B wurde einen Tag später aufgenommen. Das Eigelb hat seine Form verloren, was ein Zeichen dafür ist, dass der Embryo abgestorben ist.

Da die Vermutung bestand, dass eine unzureichende Sauerstoffversorgung ursächlich für das Absterben ist, wurde bei einem weiteren Versuch eine Petrischale mit eingearbeiteten Öffnungen für den Gasaustausch verwendet. Hierbei wurde Vergleichbares beobachtet. Auf eine Abbildung wurde deshalb verzichtet.

3.9.1.2 Glasschalen

Es wurde auch versucht, Embryonen in Glasschalen aufzuziehen (siehe 2.12.2.2). Um ein Absterben des Embryos durch eine zu trockene Umgebung zu vermeiden, wurde eine Schale auch in ein mit Wasser befülltes Becherglas gestellt. Es konnte bei keiner Variante dieser Aufzuchtmethode ein Wachstum beobachtet werden. Darüber hinaus wurde bei dem Ei in dem wassergefüllten Becherglas eine erhöhte Kontaminationsgefahr festgestellt. Auf eine Dokumentation dieser Beobachtungen wurde verzichtet, als Beispiel für eine misslungene Aufzucht kann Abb. 3.53 dienen.

3.9.1.3 Plastikbecher

Bei einem weiteren Verfahren wurde ein Plastikbecher als Gefäß benutzt (siehe 2.12.2.3). Hier kam es ähnlich wie bei der Verwendung der Petrischale nur zu einem kurzzeitigen Wachstum des Embryos (vgl. 3.9.1.1). Auch hier wurde auf eine Abbildung verzichtet.

3.9.2 Vergleich verschiedener Auftragungsmethoden

Nach der Ermittlung einer geeigneten Methode zur Aufzucht *in vitro*, wurde nach einem Verfahren zur Applikation der Testsubstanzen gesucht, dass weder die Entwicklung noch die Dokumentation beeinträchtigt.

3.9.2.1 Applikation mit Silikonring

Um die Testlösung auf eine Stelle zu begrenzen, wurde ein steriler Silikonring eingesetzt (siehe 2.12.3.1). Dieses Verfahren wurde mit der Negativkontrolle (PBS) sowie mit den Halogenimidazolen **26h** und **26i** durchgeführt (siehe Abb. 3.54). Hiervon wurden je 10 nmol aufgetragen.

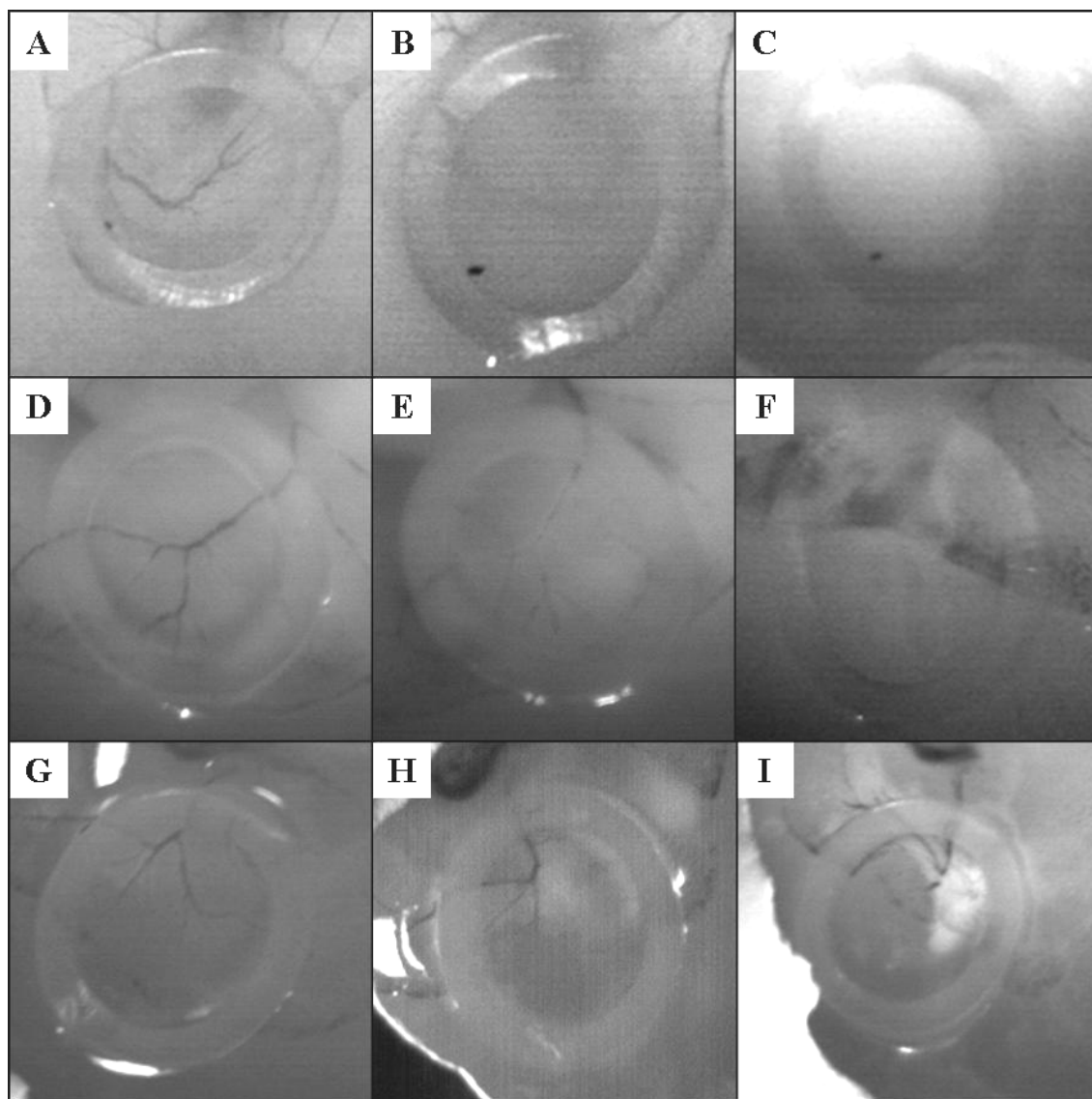


Abbildung 3.54: Auftragung der Testsubstanz unter Verwendung eines Silikonrings

Die Teilbilder A, D und G zeigen Aufnahmen von Embryonen direkt nach der Applikation der Testlösung, Teilbild B, E und H nach 3 h und Teilbild C, F und I nach 24 h. Der Embryo in Teilbild A bis C war mit PBS, der in Teilbild D bis F mit dem Chlorimidazol **26h** und der in Teilbild G bis I mit dem bromhaltigen Analogon **26i** behandelt worden.

Die Blutgefäße, die mit **26h** und die, die mit der Negativkontrolle inkubiert worden waren, verkümmerten und der Embryo starb ab. Die Entwicklung nach der Zugabe von **26i** verlief unbeeinträchtigt weiter. Man erkennt also, dass der Silikonring das Ergebnis verfälschen kann. Aus diesem Grund wurden weitere Auftragungsmöglichkeiten getestet, die einen weniger starken Einfluss haben sollten.

3.9.2.2 Applikation über Plättchen

Die Auftragung erfolgte hierbei durch das Auflegen eines mit 100 nmol der Testsubstanz versetzten Zellstoffplättchens (siehe 2.12.3.2). Die untersuchte Verbindung war **26h** (siehe Abb. 3.55).

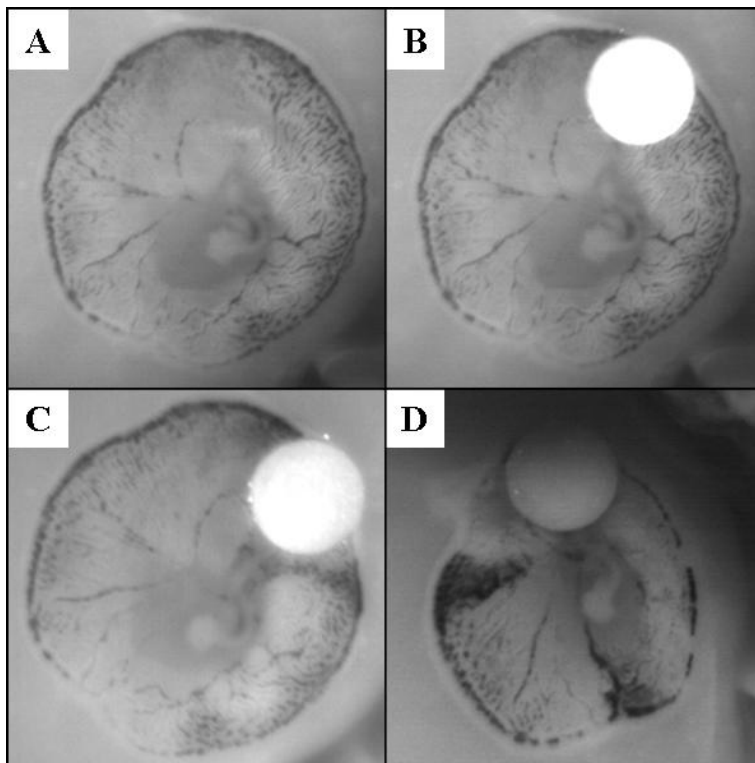


Abbildung 3.55: Auftragung der Testsubstanz unter Verwendung eines Zellstoffplättchens

In Teilbild A ist der Embryo vor der Aufbringung des Plättchens zu sehen, in Teilbild B danach. Teilbild C zeigt ihn nach 5 h, Teilbild D nach 24 h.

Bei diesem Verfahren machte sich die Wirkung von **26h** trotz höherer Dosis in deutlich geringerem Maß und nur in unmittelbarer Nähe des Plättchens bemerkbar. Darüber hinaus klebte dieses am Untergrund fest, so dass ein nachträgliches Abnehmen ohne massive Schädigung des umliegenden Gewebes nicht mehr möglich war. Das disqualifiziert auch diese Methode.

3.9.2.3 Direkte Applikation

Bei der direkten Applikation wurde auf die Verwendung von Hilfsmitteln zur Aufbringung verzichtet und die Testlösung direkt auf die Blutgefäße gegeben (siehe 2.12.3.3). Der Beobachtungszeitraum wurde auf eine Dauer von drei Tagen erhöht. In Abb. 3.56 ist die Embryonalentwicklung nach Zugabe von PBS und **26h** zu sehen. Die aufgetragene Menge betrug 10 nmol.

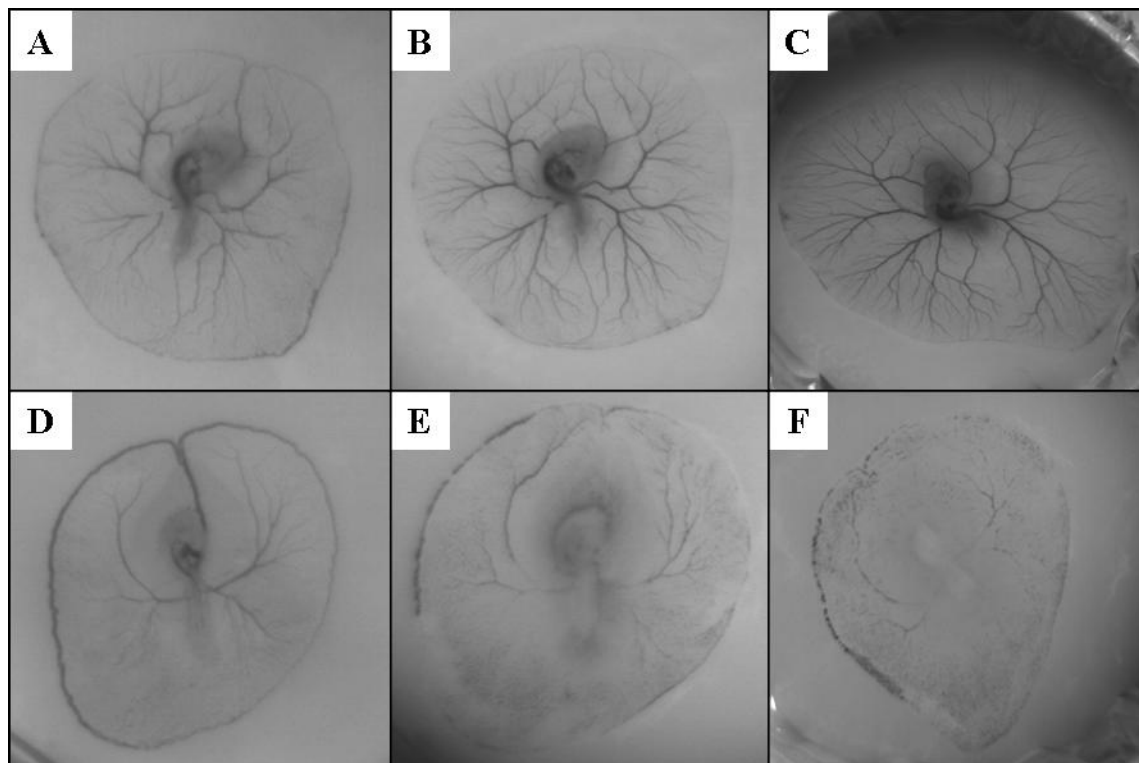


Abbildung 3.56: direkte Applikation der Testsubstanz

In Teilbild A und D sind Embryonen direkt nach der Auftragung der Testlösung abgebildet, in Teilbild B und E nach einem Tag und in Teilbild C und F nach drei Tagen. Der Embryo in Teilbild A bis C war mit PBS, der in Teilbild D bis F mit **26h** inkubiert worden.

Diese Methode erwies sich als die einzig praktikable. Man sah keinen Effekt bei der Negativkontrolle, wohl aber bei der Testsubstanz. Bei der Dokumentation traten keine Probleme auf. Aus diesem Grund wurde nur noch dieses Verfahren bei den weiteren Untersuchungen eingesetzt.

3.9.3 Wirkung verschiedener Substanzen im CAM-Assay

Mit dem optimierten CAM-Assay wurden verschiedene Verbindungen untersucht. Präparation der Eier, Applikation der Testsubstanzen und Dokumentation erfolgten hierbei wie unter 2.12.1, 2.12.3.3 und 2.12.4 beschrieben. In Abb. 3.57 bis 3.61 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Von Illudin M **11** waren auch 20 nmol verabreicht worden, da bei einer Hydrolyse des Diesters **27k** zwei Moleküle **11** freigesetzt werden würden.

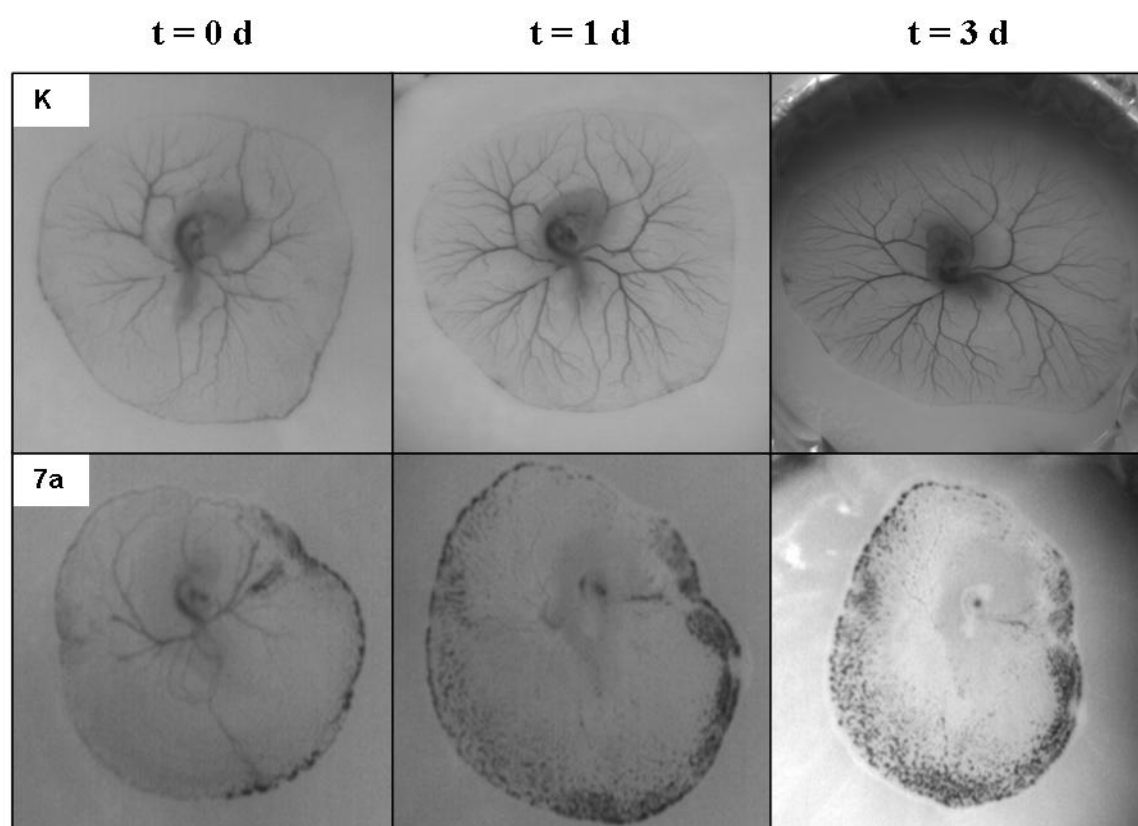


Abbildung 3.57: Negativ- und Positivkontrolle des CAM-Assays

Die Teilbilder zeigen Embryonen, die mit PBS (**K**) bzw. Combretastatin A-4 **7a** behandelt worden sind. Die antivaskuläre Wirkung von **7a** ist bekannt. Die Bilder links wurden direkt nach Auftragung der Testlösung aufgenommen, die mittleren nach einem Tag und die rechten nach drei Tagen.

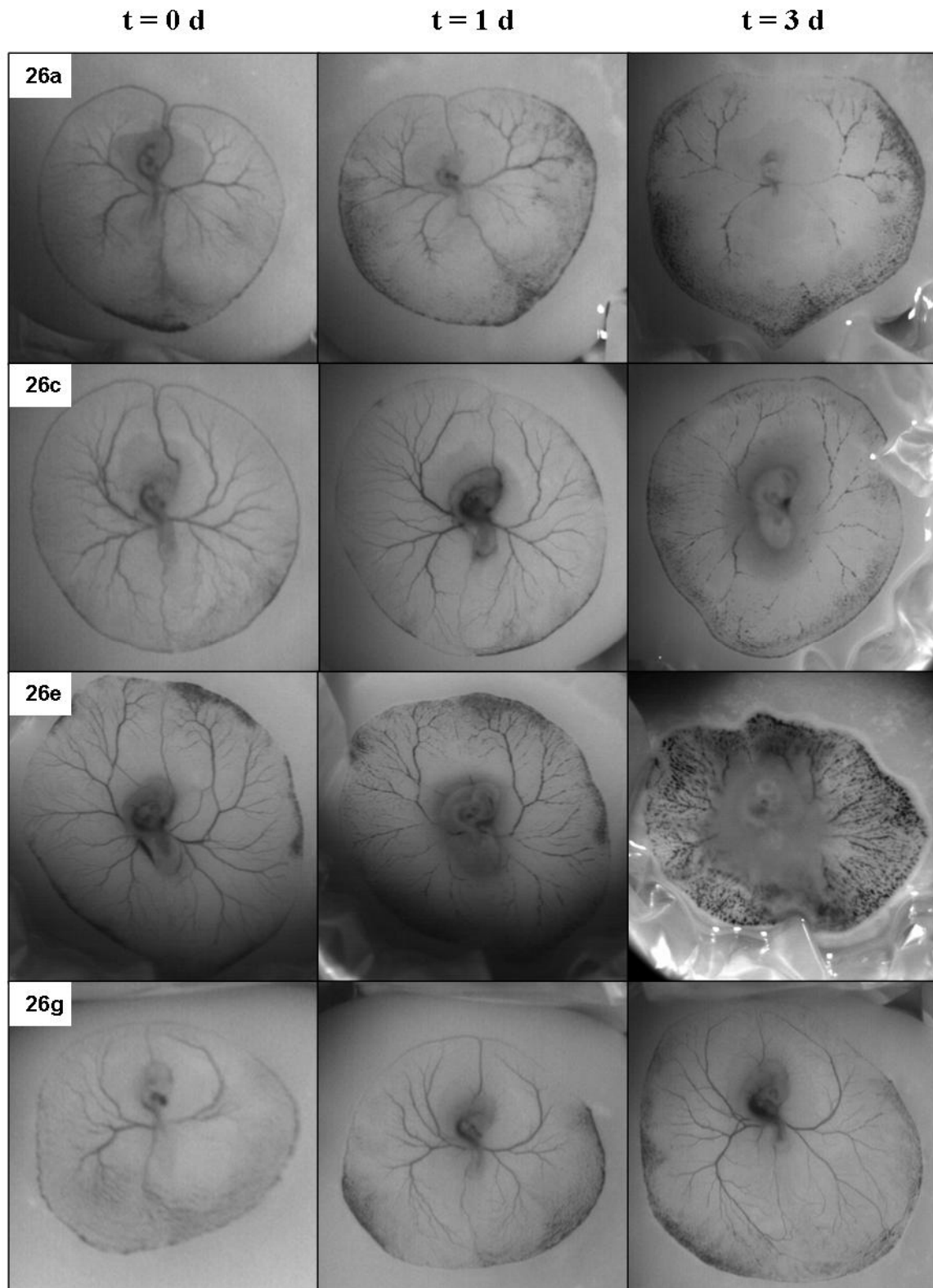


Abbildung 3.58: CAM-Assay mit Oxazolen

In den Abbildungen sieht man Embryonen, die mit verschiedenen Oxazolen **26** inkubiert worden sind. Die linke Reihe zeigt sie direkt nach der Applikation, die mittlere einen Tag, die rechte drei Tage später.

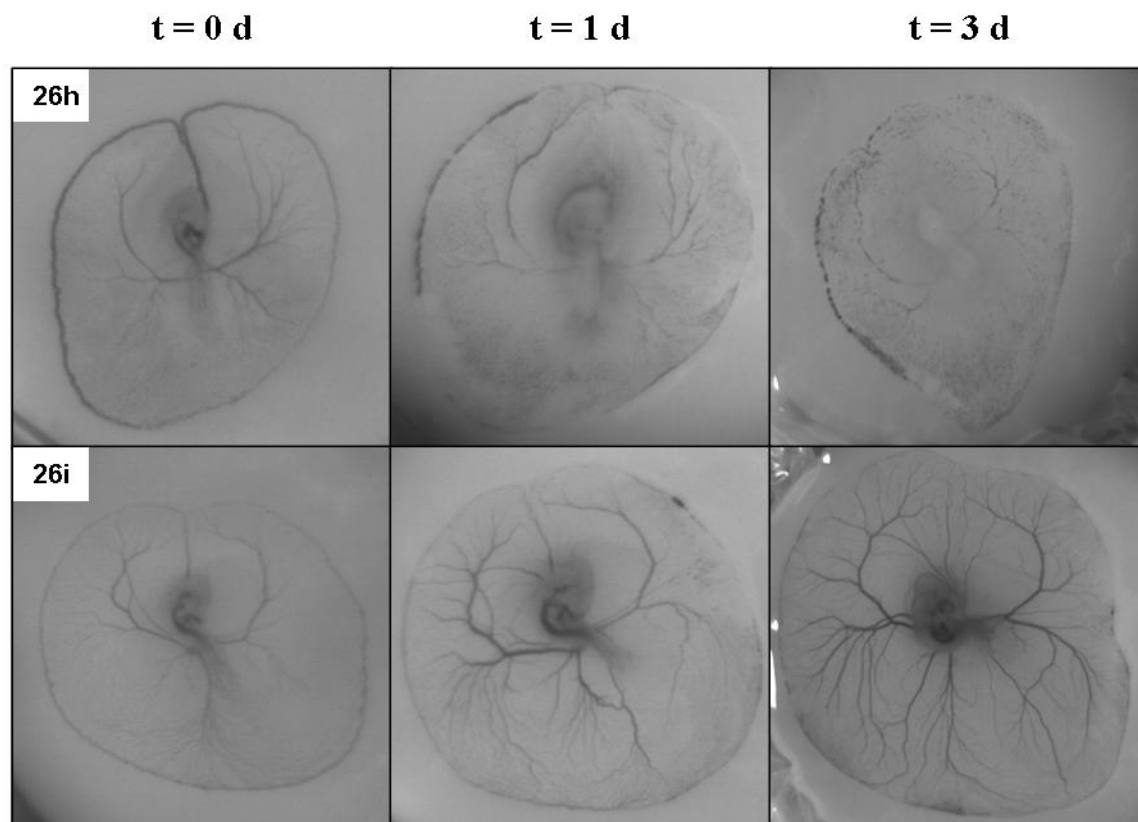


Abbildung 3.59: CAM-Assay mit Imidazolen

In den Bildern sind Embryonen dargestellt, die den halogenierten Imidazolen **26h** und **26i** ausgesetzt worden sind. Links sieht man sie direkt nach der Applikation, in der Mitte nach einem, rechts nach drei Tagen.

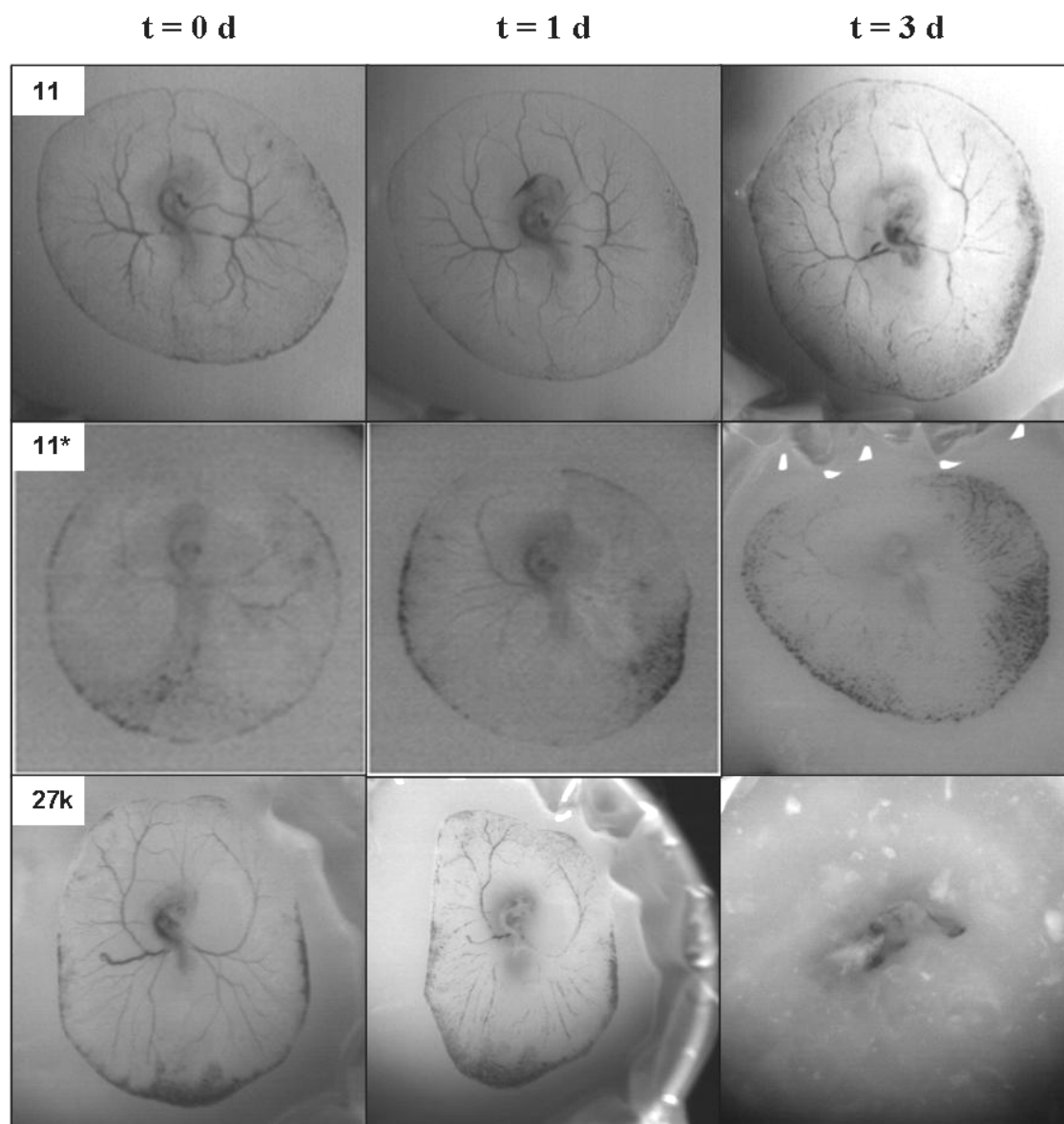


Abbildung 3.60: CAM-Assay mit Illudinen

Die Embryonen in dieser Abbildung waren mit Illudin M **11** bzw. dessen Ferrocendieseter **27k** behandelt worden. In der **11*** gekennzeichneten Reihe betrug die aufgetragene Menge an **11** 20 nmol. Die Bilder wurden direkt nach der Auftragung (links), nach 1 d (mitte) und nach 3 d (rechts) aufgenommen.

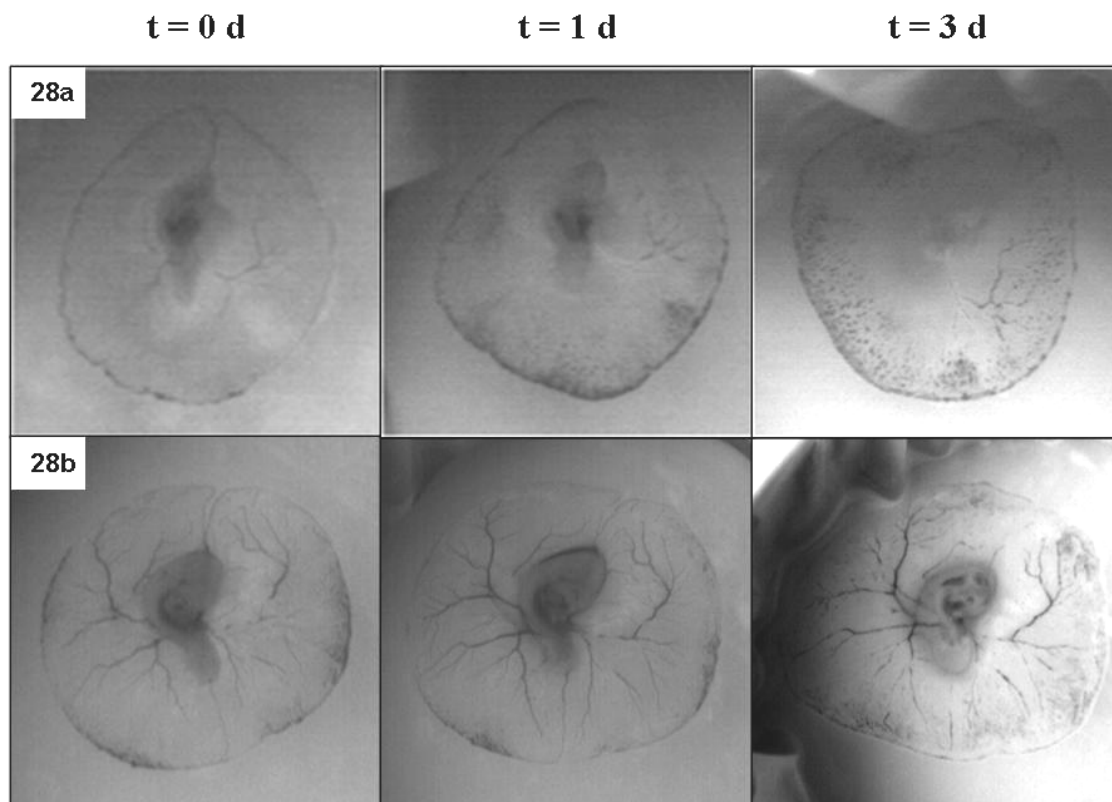


Abbildung 3.61: CAM-Assay mit Metallocenen

Bei diesen Embryonen erfolgte die Inkubation mit dem Ferrocen **28a** und dem Ruthenocen **28b**. Auch hier wurden die Bilder direkt nach der Applikation (links), nach 1 d (mitte) und nach 3 d (rechts) aufgenommen.

4. Diskussion

4.1 Gewinnung von Illudin M und S

4.1.1 Nachweis von Illudin M und S

Wie man anhand der gut reproduzierbaren Ergebnisse (siehe Abb. 2.18, Tab. 3.1 und 3.2) erkennen kann, konnte eine verlässliche Methode zur Quantifizierung des Gehalts an Illudin M **11** bzw. Illudin S **11a** entwickelt werden (siehe 2.2.1). Diese lässt sich allerdings nur für rein analytische Zwecke anwenden, da **11** und **11a** bei der Untersuchung abgebaut werden. Der Grund hierfür ist offenbar im Laufmittel Methanol zu suchen. Trotz dieser Einschränkung wurde die HPLC-Methode weiterhin verwendet, da durch die Zugabe von Methanol erst unmittelbar vor dem Einspritzen ein vorzeitiger Abbau vermieden werden konnte. Das Medium selbst kann nicht getestet werden, vor der Analyse ist erst dessen Extraktion notwendig.

4.1.2 Gewinnung von Illudin M

Für die Gewinnung von Illudin M **11** ist der Pilz *Omphalotus olearius* besser geeignet als der Pilz *Pleurotus japonicus*. Zum einen produziert er mehr **11** und zum anderen wächst er auch schneller. Das optimale Medium für die Aufzucht ist das als HA- bezeichnete (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.2). Da dieses einen vergleichsweise geringen Nährstoffgehalt besitzt, würde das für die Annahme sprechen, dass **11** von dem Pilz als Abwehrstoff unter Stressbedingungen ausgeschüttet wird und möglicherweise als Fraßschutz dient. Das optimale Verfahren zur Gewinnung von **11** ist die Extraktion nach Kutscher-Steudel (siehe 2.2.3.2 und 2.3.2). Zwar liefert die Extraktion durch Ausschütteln mit Essigsäureethylester eine geringfügig größere Menge der gewünschten Verbindung, doch im Hinblick auf den deutlich geringeren Zeitaufwand der Alternative kann man diesen Verlust als tolerierbar betrachten (siehe 3.1.2.2). Die Extraktionsdauer wurde auf 5,5 h festgelegt, da eine nachträgliche Extraktion des bereits extrahierten Mediums nur noch eine sehr kleine Menge an **11** liefert (siehe Tab. 3.4). Was die Isolierung von **11** aus dem Rohextrakts betrifft, erwies sich die beschriebene säulenchromatographische Aufreinigung mit anschließender

Umkristallisation (siehe 2.3.3) als die sinnvollste Variante. Da diese Aufreinigungsmethode zuverlässig funktionierte, wurde auch auf das Austesten weiterer Möglichkeiten verzichtet.

4.1.3 Gewinnung von Illudin S

Der Pilz *Omphalotus olearius*, gewachsen im Medium HA-, liefert auch die größte Menge an Illudin S **11a** (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.4). Allerdings erhält man deutlich weniger **11a** als **11**. So werden für jedes mol **11a** 1,5 mol **11** gebildet (siehe Tab. 3.1 und 3.2). Außerdem konnte **11a** mit allen getesteten Verfahren nur äußerst unzureichend und bei der großtechnischen Gewinnung überhaupt nicht mehr aus dem Medium gewonnen werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben. So ist die Verbindung durch die primäre Hydroxylgruppe reaktiver und kann sich leichter zersetzen. **11a** ist dadurch auch polarer als **11** und lässt sich deshalb schwerer extrahieren. Auch ließen sich erst bei einer hohen Fraktionszahl Spuren von **11a** detektieren, d.h. die Verbindung blieb stark am Säulenfüllmaterial haften und ließ sich evtl. nicht vollständig ablösen. Zudem bleibt der endgültige Beweis, dass **11a** überhaupt isoliert werden konnte, aus. Dafür, dass **11a** erhalten wurde, sprechen Absorptionsspektrum und Laufverhalten bei der HPLC, die ähnlich dem von **11** sind (siehe Abb. 2.17) sowie die charakteristischen Peaks, die bei ¹H-NMR-Analyse detektiert werden konnten (siehe Abb. 2.21). Allerdings kann man aufgrund der Verunreinigungen nicht gänzlich ausschließen, dass diese von anderen Inhaltsstoffen des Gemisches herrühren.

4.1.4 Gewinnung von Illudin M unter Einsatz von XAD16

Die Verwendung von XAD16 ist nicht sinnvoll. Die gewonnene Gesamtmenge an **11** war geringer als bei der herkömmlichen Isolierung. Je nach Variante entsprach diese 11% bzw. 79% des Referenzwertes. Auch war der größte Teil von **11** im Medium zu finden und nur sehr wenig tatsächlich an das Harz gebunden (siehe Tab. 3.6 und Abb. 3.8). Für das Herauslösen des gebundenen Rohprodukts war eine sehr große Menge an Lösungsmitteln notwendig, so dass diese Methode selbst bei einer deutlichen Steigerung der Ausbeute kaum wirtschaftlich wäre.

4.1.5 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Bei allen festgestellten Ergebnissen sollte man bedenken, dass es Faktoren gibt, die deren Verlässlichkeit beeinträchtigen. Ein großer Unsicherheitsfaktor ist die Myzelbildung des Pilzes. So ist es kaum möglich, die genaue Menge Pilz in einem Ansatz zu bestimmen und deshalb kann es sein, dass sich ein Ansatz schneller entwickelt als ein anderer. Dadurch kann man auch nicht feststellen, zu welchem Zeitpunkt die Produktion ein Maximum erreicht hat. Und eine kontinuierliche Verfolgung des Illudingehaltes im Medium ist aufgrund der dazu benötigten Probenmenge nicht ohne größere Verluste durchführbar. Deshalb kann der optimale Erntezeitpunkt auch nur vermutet werden. Unter diesen Gesichtspunkten ist auch eine Wiederholung unter gleichen Bedingungen zur besseren statistischen Absicherung der Resultate nur bedingt möglich. Weitere mögliche Fehlerquellen können der Wechsel der Analysemethode und der Pilzkultur sein. Außerdem lassen sich die im analytischen Maßstab ermittelten Ergebnisse nur bedingt auf ein größeres System übertragen. So betrug der ermittelte Gehalt an **11** im analytischen Ansatz 64,40 mg/l, im Großansatz jedoch nur 46,75 mg/l (siehe Tab. 3.1 und 3.3). Die Gründe für diese *Scale up*-Effekte können vielfältig sein. So kann es z.B. sein, dass in den analytischen Ansätzen eine bessere Durchmischung, ein leichter Gasaustausch oder ein vorteilhafteres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen vorliegen. So sollten die ermittelten Ergebnisse auch nicht als absolute Werte, sondern vielmehr als Richtwerte angesehen werden. Als solche sollten sie allerdings recht zuverlässig sein. Alles in Allem konnte eine optimale Methode zur Gewinnung von Illudin M **11** gefunden werden, aber nicht zur Gewinnung von Illudin S **11a**.

4.2 Stabilitätsuntersuchungen

4.2.1 Substanzuntersuchungen per HPLC

Bei dem Menthol-Platinkomplexkonjugat **13a** blieben die Messwerte nach einer Inkubation von 18 h konstant auf einem Niveau von 60% (siehe Abb. 3.9). Würde eine Hydrolyse vorliegen, würde man ein lineares oder graduelles Absinken der Absorption erwarten, aber keinen schnellen Rückgang auf einen gleichbleibenden Wert. Eine Möglichkeit wäre, dass eine Esterspaltung stattfindet und ein Gleichgewichtszustand erreicht wird, in dem kaum noch ein Abbau stattfindet. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass ein Teil von **13a** bei der HPLC-Analyse nicht richtig detektiert werden konnte, da er in Lösung ausfiel. Bei der Analyse des Estradiol-Platinkomplexkonjugats **16c** sowie des an Tamoxifen **6** angelehnten Platinkomplexkonjugats **18** konnte so gut wie kein Abbau festgestellt werden. Die einzelnen Messpunkte weisen nur eine geringe Abweichung vom Mittelwert auf (siehe Abb. 3.10 und 3.11). Während der Untersuchung von **16c** wurde immer ein Hintergrund gemessen (siehe Abb. 3.10). Dieser beeinträchtigt aber nicht die Sensitivität der Meßmethode, da das bei einer Spaltung entstehende **5b** sofort zu einer relativen Erhöhung der Absorption führen würde.

4.2.2 Zusammenfassung und Problemdiskussion der HPLC-Methode

Das Verfahren eignet sich nicht für ein breitgefächertes Screening sondern kann nur stichprobenartig eingesetzt werden. Denn man hat keine einheitliche Methode, sondern muss für jede Verbindung erst die optimalen Rahmenbedingungen finden. Die Konzentration der untersuchten Verbindungen entsprach zudem nicht der bei den Zelltests, weshalb man die ermittelten Resultate auch nur bedingt auf physiologische Systeme anwenden kann. Diese Anpassung war jedoch notwendig, damit man auch schwache Spuren einer Hydrolyse erkennen kann. Infolge der erhöhten Substanzkonzentration kam es teilweise vor, dass ein kleiner Teil der Substanz in der Lösung ausfiel. Auch wenn das gründliche Durchmischen des Inkubationsansatzes vor der Untersuchung keine Garantie dafür ist, dass ein homogener Teil des Ansatzes analysiert wird, sollte der Einfluss auf die Resultate eher gering sein. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass man derartige Tests nur mit Verbindungen durchführen kann, die einen deutlichen Absorptionsunterschied verglichen mit den potentiellen Spaltprodukten aufweisen.

4.2.3 Spektrometrische Substanzuntersuchungen

Bei dem Steroid-Rutheniumkomplexkonjugat **19a** wurde eine Verringerung der Absorption beobachtet, was darauf schließen lässt, dass es zu einer Spaltung der Esterbindung kommt (siehe Abb. 3.12 und 3.13). Der größte Absorptionsrückgang ist hierbei innerhalb der ersten 3 h zu verzeichnen, danach sind nur noch schwache Änderungen festzustellen. Auch hier wäre eine denkbare Erklärung, dass ein *steady state* vorliegt. Ein teilweises Ausfallen der Substanz in Lösung wie bei **13a** wurde nicht beobachtet. Interessant ist diese Beobachtung im Vergleich mit **19b**. Strukturell unterscheiden sich beide Moleküle nur geringfügig durch den Austausch einer Methoxy- gegen eine Ethoxygruppe, allerdings legen sie ein unterschiedliches Verhalten an den Tag. **19b** weist eine deutlich höhere Absorption auf als das korrespondierende Methoxy-Derivat **19a** und scheint außerdem deutlich stabiler zu sein. Denn auch nach einer einwöchigen Inkubation war bei **19b** kaum eine Abnahme der Absorption zu verzeichnen. Eine offensichtliche Ursache für diese unterschiedlichen Resultate ist nicht zu erkennen. Der Einfluss der beiden Gruppen auf die Reaktivität der Moleküle – z.B. über einen induktiven Effekt – dürfte sich kaum unterscheiden.

4.2.4 Problemdiskussion und Vergleich der beiden Methoden

Die unter 2.4.2 beschriebene Methode über den Vergleich der Absorption lässt sich wesentlich schneller und unkomplizierter durchführen als das unter 2.4.1 beschriebene Verfahren per HPLC. Zudem ist der Verbrauch an Testsubstanz geringer und die Bedingungen sind während der Inkubationszeit konstanter, da keine Aliquots aus dem Ansatz entfernt werden. Der Nachteil ist, dass es sich um eine indirekte Methode handelt, bei der man nicht die bei der Esterspaltung entstehenden Produkte nachweist, was bei der anderen Methode prinzipiell möglich wäre. Somit kann man bei einem Rückgang der Absorption nicht ausschließen, dass dieser durch eine andere Reaktion bedingt ist. Wie weit die Untersuchungsbedingungen von den physiologischen abweichen, hängt von der jeweiligen Testsubstanz ab. Dieser Faktor spricht somit weder für noch gegen eine der beiden Analysemethoden. Auch wenn beide Varianten für sich genommen verlässliche Ergebnisse liefern, hängt die Wahl des Verfahrens immer von den jeweiligen Bedürfnissen und Gegebenheiten ab.

4.3 Komplexbildung

4.3.1 Untersuchung von Eisenkomplexen

Es zeigte sich bei allen verwendeten Testliganden nahezu sofort die Bildung eines Eisenkomplexes mit intensiver Färbung (siehe Tab. 3.7, 3.8 und Abb. 3.14). Die kontinuierliche Beobachtung der Absorptionsänderung sollte sicherstellen, dass sich der Komplex vollständig gebildet hatte (siehe Abb. 3.15). Da der Metall-EDTA-Komplex im Messbereich nicht absorbiert, kann dessen Einfluss auf die Rohdaten vernachlässigt werden. Da man zur Berechnung des K_D -Werts eines Komplexes den von EDTA als bekannte Konstante benötigt, war es auch nicht möglich den K_D -Wert bei pH 5,5 zu bestimmen (siehe Tab. 3.8). Bei allen untersuchten Komplexen lag der ermittelte pM-Wert im gleichen Bereich wie der von EDTA (25,1).

4.3.2 Untersuchung weiterer Metallkomplexe

Der pM-Wert der Pb^{2+} -, Ni^{2+} - und Mn^{2+} -Komplexe war kleiner als der von EDTA (20,8 bzw. 21,3 und 16,7), die Komplexe also etwas instabiler. Die Färbung war deutlich schwächer ausgeprägt als bei Fe^{3+} und es konnte auch nicht sofort ein Farbumschlag beobachtet werden. Eine Inkubation bei 70° C war notwendig. Dabei wurde auch festgestellt, dass es bei einer längeren Inkubationszeit zu einem Rückgang der Absorption kommen kann (siehe Abb. 3.16). Ursächlich hierfür könnten entweder eine thermische Zersetzung oder reaktive Veränderung des Moleküls sein.

4.3.3 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Der Test eignet sich gut um das chemische Verhalten eines potentiellen Liganden zu charakterisieren und zu vergleichen, hat aber auch seine Grenzen. Da man, ähnlich wie bei den Stabilitätsuntersuchungen (siehe 3.2), für jede Verbindung erst die Versuchsparameter ermitteln muss, eignet sich dieses Verfahren nur für eine begrenzte Probenzahl. Und auch hier kann es vorkommen, dass man sich von den physiologischen Bedingungen entfernen muss. Darüber hinaus kann die Methode auch nicht für jede Testverbindung angewandt werden. Voraussetzung ist, dass der gebildete Komplex ein Absorptionsmaximum besitzt, das sich deutlich von dem des freien Liganden unterscheidet. Für **24** beispielsweise trifft dies nur bei pH 7,4 zu. Bei pH 5,5 kann man zwar einen Absorptionsunterschied ausmachen, dieser verläuft jedoch graduell und bildet kein Maximum (siehe Abb. 3.14). Und je geringer der Absorptionsunterschied ist, desto stärker fallen natürliche Schwankungen ins Gewicht und das Ergebnis wird unzuverlässiger. Auch handelt es sich hierbei nur um eine indirekte Meßmethode und man kann nicht ausschließen, dass die gemessenen Änderungen von anderen Ursachen herrühren.

4.4 Glutathion-Monitoring

4.4.1 Untersuchung von Illudinderivaten

Bei Illudin M **11** konnte wie erwartet ein Rückgang der Absorption, also eine Reaktion der Doppelbindung beobachtet werden (siehe Tab. 3.10, Abb. 3.17). Dies ist durch GSH bedingt, da ein vergleichbares Verhalten bei dem Kontrollansatz ohne GSH nicht auftrat. Bei den getesteten Derivaten **27** war kaum eine Änderung festzustellen. **27e**, der Diester von Demethylcantharidin und **11**, wies nach **11** die höchste Abbaurate auf. Doch selbst diese war noch um mehr als eine Größenordnung geringer als die von **11**. Dies ist ein gutes Indiz dafür, dass die hier getesteten Substanzen ein besseres Wirkungsprofil aufweisen könnten als die Mutterverbindung **11**. Der Fettsäureester **27c**, der Diester **27h** sowie die Illudinlactone **27m** und **27n** wiesen negative Abbauraten auf. Der Grund hierfür ist, dass kein messbarer Rückgang der Absorption auftrat, also die Abbaurate gleich Null sein müsste. Dabei machen sich allerdings minimale Schwankungen der Messwerte bemerkbar und verursachen so ein negatives Vorzeichen. Gleiches trifft wahrscheinlich auch auf einige positive aber vom Wert her geringe Abbauraten zu, z.B. die des Diesters mit Bipyridinbrücke **27i** (siehe Tab. 3.10). Da mit Ausnahme von **27m** und **27n** alle getesteten Verbindungen Mono- bzw. Diester von **11** darstellen (siehe Abb. 2.13 bis 2.15), lag die Vermutung nahe, dass allein schon die Veresterung der Hydroxylgruppe am C6 ausreicht, um eine Reaktion der Doppelbindung zu unterbinden. Um diese These zu untermauern, war der Acetylesther **27a**, der einfachste mögliche Ester von **11**, untersucht worden. Hier wurde das gleiche Phänomen beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Rest den Angriff sterisch behindert, so dass das GSH sein Ziel nicht erreicht. Denkbar wäre aber auch, dass ein von der Hydroxylgruppe ausgehender -I-Effekt notwendig ist, um die Doppelbindung so weit zu destabilisieren, dass ein nukleophiler Angriff durch GSH möglich wird. Rein theoretisch ist es möglich, dass sich infolge der Derivatisierung das Absorptionsmaximum der Doppelbindung verschiebt. Aus diesem Grund wurden Absorptionsspektren vor und nach der Inkubation aufgenommen (siehe Abb. 3.17). Es konnte kein Unterschied beobachtet werden, was zeigt, dass keine Reaktion stattgefunden hat.

4.4.2 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Das GSH-Monitoring liefert relativ zuverlässige und reproduzierbare Daten, allerdings kann man aus ihnen nicht auf eine cytotoxische Wirkung schließen. Und zur Bestätigung der Vermutung, dass die untersuchten Verbindungen selektiver sind, sind ebenfalls weitere Tests von Nöten. Ein Problem besteht darin, dass Reaktion und Absorption vom pH-Wert abhängig sind. D.h. die Messung kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden und unter anderen Bedingungen kann es sein, dass man andere Resultate erhält. Auch wird die Reaktion nur indirekt über eine Absorptionsänderung gemessen und man kann deshalb nicht vollkommen ausschließen, dass beobachtete Effekte andere Ursachen haben. Eine Möglichkeit zur Verifizierung der Ergebnisse wäre die mit der Öffnung der Doppelbindung einhergehende Signalverschiebung im ^1H -NMR zu messen.

4.5 Vergleich des Alkylierungspotentials

4.5.1 Einfluss des Lösungsmittels

Der Lösungsmittelgehalt im Ansatz ist relativ gering, reicht aber aus um einen deutlichen Unterschied hervorzurufen (siehe Tab. 3.11). Da DMF als polar aprotisches Lösungsmittel gut geeignet ist, um nukleophile Substitutionen zu unterstützen, ist dieser Effekt allerdings nachvollziehbar. Es wurde deshalb darauf geachtet, dass bei den nachfolgenden Versuchen alle untersuchten Testsubstanzen in DMF gelöst waren, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

4.5.2 Einfluss der Inkubationszeit

Es ergab sich, wie erwartet, ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Absorption (siehe Abb. 3.18). Analog zum EC_{50} wurde die Inkubationszeit bestimmt, die notwendig ist um die Hälfte des Nicotinamids zu alkylieren. Diese beträgt bei der eingesetzten Konzentration 17,5 min. Die konstante Konzentration von Epichlorhydrin **34** war hierbei höher als der EC_{50} -Wert, so dass man auch bei einer Verkürzung der Inkubationszeit noch gut unterscheidbare Ergebnisse erhält. Auf eine Ermittlung des Einflusses der Reaktionstemperatur wurde verzichtet, da eine Entwicklung entsprechend der Van't-Hoff'schen Regel zu erwarten ist. Bei allen Versuchen wurde sie gemäß der Literatur bei 60° C belassen um möglichst deutliche Resultate zu bekommen.

4.5.3 Zusammenfassung und Problemdiskussion der Methode mit Aceton

Die Durchführbarkeit dieser Variante des Alkylierungsassays hängt stark von der eingesetzten Testsubstanz ab. Für die farblose Modellsubstanz Epichlorhydrin **34** liefert sie genaue und verlässliche Ergebnisse (siehe Abb. 2.31). Es konnte auch für die meisten anderen Testsubstanzen ein EC₅₀-Wert ermittelt werden. Jedoch stellt deren Eigenabsorption einen Unsicherheitsfaktor dar, selbst wenn sie meist nur schwach ausgeprägt war (siehe Tab. 3.12). Deutliche Auswirkungen sind bei der Ursprungsverbindung Illudin M **11** und bei dessen Monoester mit Retinsäure **27b** zu verzeichnen. Diese Daten kann man nicht mehr als zuverlässig ansehen. Der in Verbindung **27i** enthaltene Bipyridin-Linker weist, wie auch Nicotinamid **33**, eine strukturelle Ähnlichkeit gegenüber der DNA auf und könnte deshalb selbst als Substrat fungieren. Tritt dies auf, wäre das gemessene Alkylierungspotential folglich geringer als das tatsächliche und würde zudem von der eingesetzten Substanzkonzentration abhängen. Bei dem Alkylierungsassay handelt es sich nur um eine Bestimmung der chemischen Eigenschaften. Man kann daraus nicht unweigerlich auf eine mögliche biologische Aktivität schließen, zumal die Bedingungen im Reaktionsansatz nicht den physiologischen entsprechen.

4.5.4 Diskussion der alternativen Untersuchungsmethode mit Acetophenon

Dieses Verfahren eignet sich nicht zur Untersuchung von Alkylanzien. So wurde zum einen für die Musterverbindung Benzylbromid **40** ein Wert gemessen, der kaum den Tatsachen entsprechen kann. Zum anderen sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar, wie man anhand der ermittelten Standardabweichung erkennen kann. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Analyse des acetylgeschützten Illudinlactons **27n**. Laut der gewonnenen Daten scheint diese Verbindung das Substrat überhaupt nicht zu alkylieren, doch die hohe Standardabweichung sorgt auch hier für Zweifel an der Richtigkeit. Aufgrund dieser Resultate wurde von weiteren Untersuchungen mit dieser Methode abgesehen.

4.6 Der TUNEL-Test

4.6.1 Methodenentwicklung

Die Durchführung nach Jobmann (siehe 2.9.1) stellt das bessere Verfahren als die in der Gebrauchsanweisung beschriebene Variante dar. Sie ist schonender aufgrund der geringeren Zahl der Zentrifugationsschritte und der Vermeidung einer mechanischen Schädigung durch die festen Paraformaldehydstücke. Zwar besteht bei der Überschichtung der Zellen mit PBS eine größere Gefahr des Zellverlustes, doch lässt sich dies durch eine Erhöhung der Zelldichte beim Auftragen und eine Reduzierung der Zahl der Waschschrte umgehen. Letzteres birgt zwar die Gefahr eines stärkeren Hintergrunds bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung, doch fiel dies in der Praxis kaum ins Gewicht.

4.6.2 Untersuchung der Testsubstanzen

Die Verbindungen mit der stärksten proapoptotischen Wirkung waren allesamt Illudinderivate. Dies war aufgrund der bekannten Wirkung der Muttersubstanz Illudin M **11** zu erwarten. Für das Cisplatinderivat **13a**, Illudin M **11** sowie die Illudin-Ferrocen-Konjugate **27j** und **27k** waren Konzentration und Inkubationszeit auch dem jeweiligen IC₅₀ für 24 h angeglichen worden (siehe 3.6.7). Es wurde erwartungsgemäß ein Anteil apoptotischer Zellen von ca. 50% festgestellt. Die inaktiven Substanzen können keiner speziellen Stoffklasse zugeordnet werden. Dass bei einem Großteil der Tests ein proapoptotischer Effekt festgestellt wurde, ist darauf zurückzuführen, dass nur Verbindungen getestet wurden, deren cytotoxische Wirkung bereits bekannt war. Substanzen, die trotz ihrer Cytotoxizität nur bei einem geringen Teil der Zellen Apoptose auslösten, sind folglich als eher nekroseinduzierend einzuschätzen. Der geringe, aber nichtsdestotrotz vorhandene Anteil apoptotischer Zellen bei der Negativkontrolle lässt sich dadurch erklären, dass auch in gesunden Populationen vereinzelt Zellen auf natürlichem Weg absterben. Interessant ist die Tatsache, dass das bromhaltige Imidazolderivat **26i**, das sich nur durch die Substitution des Halogens vom chlorhaltigen **26h** unterscheidet, bei den HT 29-Zellen eine deutlich schwächere Wirkung aufweist. Ein ähnliches Verhalten konnte auch beim CAM-Assay beobachtet werden (siehe Abb. 3.59, siehe 4.9.3). Dies zeigt, dass selbst kleinste Strukturveränderungen große Auswirkungen hinsichtlich der biologischen Aktivität zur Folge haben können. Derivate eines bekannten

Wirkstoffe müssen also nicht zwangsläufig eine ähnliche Wirkung haben. In diesem Fall könnte z.B. die höhere Elektronegativität des Chlors für die Unterschiede verantwortlich sein.

4.6.3 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Man kann den TUNEL-Test trotz des finanziellen und zeitlichen Aufwands in einem relativ großen Rahmen durchführen. Er lässt sich für jede Zelllinie und jede Stoffklasse anwenden und liefert zuverlässige Ergebnisse. In seltenen Fällen kann auch bei nekrotischen Zellen eine DNA-Stückelung auftreten, die zur Fluoreszenz führt. Allerdings weisen diese Zellen die für Nekrose charakteristische Morphologie auf und sind deshalb gut von den apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Es ist zu erkennen, dass bei einigen Testsubstanzen die Standardabweichung relativ hoch war. Dabei muss man jedoch bedenken, dass lebendige Organismen untersucht werden, die sich nicht zu jedem Messzeitpunkt vollkommen gleich verhalten. Eine mögliche Abhilfe würde darin bestehen, die Zahl der Wiederholungen zu erhöhen. Aufgrund der hohen Kosten wurde allerdings darauf verzichtet. Da ein Zelltest allein kein vollkommen sicheres Ergebnis liefert, sollten die ermittelten Ergebnisse auch immer im Zusammenhang mit anderen Tests betrachtet werden.

4.7 Der Annexin-Test

4.7.1 Zusammenfassung und Problemdiskussion im Vergleich mit dem TUNEL-Test

Die Durchführung des Annexin-Tests mit den HL 60-Zellen war ohne technische Probleme machbar, jedoch konnte nicht immer ein verwertbares Ergebnis erzielt werden. Einige Substanzen, wie z.B. das Menthol-Rutheniumkomplexkonjugat **14**, die Menthol-Platinkomplexkonjugate **15d** und **15e**, das Chalkon-Platinkomplexkonjugat **21b** oder das harnstoffhaltige Oxazol **26b**, die laut TUNEL-Test apoptoseinduzierend sein müssten, wiesen beim Annexin-Test einen hohen Anteil nekrotischer Zellen auf (siehe Tab. 3.15 bis 3.16 und Abb. 3.22 bis 3.23 sowie Tab. 3.24 bis 3.25 und Abb. 3.30). Die Ursache hierfür ist, dass man beim Annexin-Test spätapoptotische Zellen nicht von nekrotischen unterscheiden kann und deshalb besonders wirksame Verbindungen als nekroseinduzierend erscheinen können. Zur Untermauerung dieser Annahme wurden für ausgesuchte Verbindungen Konzentration und Inkubationszeit herabgesetzt (siehe 3.7.2). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorhergehenden (siehe 3.7.1) zeigt, dass durch diese Anpassung der Anteil apoptotischer Zellen in Relation zu den nekrotischen zunahm. Ein Nachteil dieser Modifikation war jedoch, dass gleichzeitig der Anteil vitaler Zellen anstieg. Dadurch nimmt der Einfluss natürlicher Schwankungen zu, so dass eine statistisch relevante Aussage kaum getroffen werden kann. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist, dass die Zahl der auswertbaren Zellen bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen relativ gering war, was die statistische Relevanz schmälert. Trotz dieser Einschränkungen konnten für einige Substanzen glaubwürdige Daten gewonnen werden, die sehr gut mit den Resultaten des TUNEL-Tests harmonieren. Die Terpen-Platinkomplexkonjugate **15c** und **15l** z.B. agierten proapoptotisch, das Menthol-Platinkomplexkonjugat **13m**, das Platinkomplexkonjugat mit Methoxyestron **16d** und das Oxazol **26a** hingegen nekroseinduzierend. Bei der Negativkontrolle war der Anteil vitaler Zellen erwartungsgemäß sehr groß. Die wenigen toten Zellen sind durch natürliches Absterben zu erklären.

4.7.2 Problemdiskussion der Untersuchung adhärenter Zellen

Die unter 2.10.2.1 beschriebene Methode, bei der die Zellen vor dem eigentlichen Test durch Trypsin vom Untergrund gelöst werden, ist gänzlich ungeeignet zur Untersuchung adhärenter Zellen. In Abb. 3.36 ist zu erkennen, dass der größte Teil der Zellen rot fluoresziert, unabhängig davon, womit die Zellen vorher inkubiert worden waren. Rotfluoreszenz wäre normalerweise ein Zeichen für das Vorliegen von Nekrose, aber die Tatsache, dass sie bei allen getesteten Substanzen – auch bei der Negativkontrolle – festgestellt wurde, lässt nur den Schluss zu, dass die Fluoreszenz eine Folge der Trypsinierung ist. Auch der Einsatz von weniger Trypsin-EDTA oder eine kürzere Inkubationszeit würde kein aussagekräftiges Ergebnis liefern, da man diesen Einfluss nie gänzlich ausschließen könnte. Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich Veränderungen bzw. Schäden der Zellmembran. Da ein Ablösen der Zellen vom Untergrund nicht möglich war, wurde versucht, sie auf einem mikroskopierbaren Substrat wachsen zu lassen (siehe 2.10.2.2). Abb. 3.37 zeigt, dass collagenbeschichtete Objektträger hierfür ungeeignet sind, da das markierte Annexin auch an zellfreie Bereiche des Untergrunds binden kann. Somit ist es nicht möglich gefärbte Zellen von solchen zu unterscheiden, bei denen die Fluoreszenz nur durch die Bindung des Farbstoffes an den Objektträger zu Stande kommt. Zudem besteht durch dieses Abfangen des Annexins die Gefahr, dass es nicht in ausreichender Menge zu den Zellen gelangen kann. Deswegen wurde von einer weiteren Verwendung collagenbeschichteter Trägermaterialien abgesehen und käuflich erworbene Artikel hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Auch der Einsatz von Chamber Slides lieferte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Es trat zwar keine Hintergrundfluoreszenz wie bei den Objektträgern mit Collagen auf (siehe Abb. 3.39), die Zellen wuchsen aber nur sehr unregelmäßig an (siehe Abb. 3.38). Deshalb wurde auf die Verwendung von 24-Well-Mikrotiterplatten umgestiegen, da die Zellen auf diesen besser anwuchsen (siehe Abb. 3.40). Da sich tote Zellen vom Untergrund lösen, wurden auch die Zellen im Überstand untersucht. Bei deren Analyse zeigte sich, dass die Zelldichte zu gering war, um eine sinnvolle Aussage treffen zu können. Es ist zudem auch unmöglich zu sagen, in welchem Zahlenverhältnis die Zellen auf der Platte und im Medium zueinander stehen. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 16 h (siehe Abb. 3.41) führte zu keiner Veränderung. Die Zahl der Zellen Überstand blieb unverändert gering, was zeigt, dass die Zellen nach dem Ablösen nur für kurze Zeit bestehen bleiben. Als Fazit muss man ziehen, dass sich der Annexin-V-Fluos-Test, anders als der TUNEL-Test, nicht mit adhärenenten Zellen durchführen lässt.

4.8 Der Immunoblot

4.8.1 Methodenentwicklung

Für die geplanten Untersuchungen erwies sich ein Gel mit einer Stärke von 12% als optimal. Wenn man nur den Blot betrachtet (siehe Abb. 3.42), müssten 60 µg aufgetragenes Protein genügen um deutlich sichtbare Banden zu erhalten. Allerdings zeigte sich bei der Immunodetektion, dass man ein besseres Signal bekommt, wenn man die Menge auf 70 µg erhöht. Da Antikörper aus Tieren gewonnen werden, kann es zu chargenspezifischen Unterschieden kommen. Bei der Ermittlung der geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers wurden große Schwankungen beobachtet (siehe Abb. 3.43). Die zu Beginn verwendete Probepackung von der Firma Calbiochem, lieferte bereits bei einer Verdünnung von 1:10.000 verwertbare Ergebnisse, die käuflich erworbene Charge erst bei 1:1.000. Eine Verdünnung von 1:100 gemäß der Empfehlung des Herstellers lieferte ein zu starkes und damit unscharfes Signal (siehe Abb. 3.44). Eine Anpassung der Konzentration des sekundären Antikörpers hatte nicht zu erfolgen. Bei der Verwendung in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:10.000 traten keine Probleme auf. Die Einwirkzeit bei der Blockierung der Membran war von anfänglich 60 auf 75 min erhöht worden, um so ein besseres Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zu erzielen. Das verwendete ECL-Kit lieferte verlässliche Resultate, wenn die Komponenten nicht zu lange gelagert wurden. Es besteht nämlich die Gefahr, dass das Luminol mit der Zeit bereits durch den Luftsauerstoff oxidiert wird und das Kit somit nicht mehr verwendet werden kann. Aufgrund der Spezifität der Antikörper fand eine Molekulargewichtsbestimmung anhand des Laufmarkers nur oberflächlich statt und wurde deshalb auch nicht weiter erwähnt. Auch die Inkubationsbedingungen mussten angepasst werden. Um interpretierbare Resultate zu erhalten, mussten die Zeitpunkte der Probennahme an die Wirkgeschwindigkeit der Verbindung angeglichen werden (siehe Abb. 3.45). Um einen Überblick zu erhalten wurde zuerst auf die gröbere Zeiteinteilung zurückgegriffen, in ausgesuchten Fällen wurde das Zeitfenster verändert. Das vollständige Verschwinden der aktiven Bande in Abb. 3.45, Teilbild B liegt daran, dass es im weiteren Verlauf der Apoptose zu einem Abbau des gesamten Zellproteins inklusive Caspase 9 kommt. Am Beispiel des Isolongifolol-Platinkomplexkonjugats **13k** kann man erkennen, wie unterschiedliche Substanzkonzentrationen die Aktivierung beeinflussen (siehe Abb. 3.46). Bei einer Konzentration von 10 µM kann man nur schwache Spuren der aktiven Caspase 9 ausmachen. Ein stärkeres Signal erhält man erst, wenn sie dem IC₅₀-Wert entspricht. Dabei

scheint die Konzentration keinen Einfluss auf die zeitlichen Abläufe zu haben, da die aktive Bande in beiden Ansätzen zum gleichen Zeitpunkt auftritt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die geringere Menge nur ausreicht um bei einem Teil der Zellen Apoptose auszulösen, während sich der Rest ungehindert weitervermehrt.

4.8.2 Untersuchungen an den HL 60-Zellen

Indem man das erste Auftauchen der Bande der aktiven Caspase 9 bestimmt, kann man Rückschlüsse ziehen, auf welchem Weg die Apoptose initiiert wird. Bei dem Menthol-Platinkomplexkonjugat **13a** kommt es relativ schnell zu einer Prozessierung der Procaspase 9, was darauf hinweist, dass die Einleitung der Apoptose über den mitochondrialen Weg erfolgt (siehe Abb. 3.45). Bei dem Methylchalkon **20a** hingegen kann man erst nach einer Inkubationszeit von 24 h Spuren der aktiven Caspase 9 erkennen (siehe Abb. 3.48). Dies deutet darauf hin, dass ein anderer Signalweg der Auslöser ist und die Aktivierung der Caspase 9 nur als Folge davon auftritt. Bei den getesteten Chalkonen **20** bis **25** ist es auffällig, dass der Zeitpunkt, zu dem sich die aktive Caspase 9 erstmalig nachweisen lässt, stark variiert und die Procaspase nie vollständig verschwindet. Dies spricht dafür, dass die Prozessierung der Procaspase 9 unabhängig von der Apoptoseinitiierung stattfindet. Die Illudine **27** reagieren relativ homogen, es kommt zu einer relativ schnellen Aktivierung, allerdings verschwindet auch hier die inaktive Form niemals ganz (siehe Abb. 3.49). Die Negativkontrolle zeigt wie erwartet nur die Bande der Procaspase (siehe Abb. 3.47).

4.8.3 Untersuchungen an den 518 A2-Zellen

Aktive und inaktive Form der Caspase 9 befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht, das je nach Zellart unterschiedlich ausgeprägt ist. Bei den 518 A2-Zellen bestand das Problem, dass bereits zu Beginn der Inkubation die aktive Caspase 9 nachgewiesen werden konnte. Deshalb kann zur Auswertung auch nicht der Zeitpunkt des ersten Erscheinens herangezogen werden, sondern sie erfolgt in diesem Fall durch den Vergleich der Bandenstärke. Bei den adhärennten Zellen stellen die zum Zeitpunkt 0 h genommenen Proben gleichzeitig die Negativkontrolle dar. Man könnte jetzt anführen, dass die beim ersten Messpunkt nachgewiesene aktive Caspase 9 nur ein Artefakt darstellt, doch würde man diesen

Effekt dann nicht ausnahmslos bei allen Versuchen beobachten. Unter Vorbehalt dieses Unsicherheitsfaktors scheinen die Illudinderivate **27** bei den 518 A2-Zellen zu vergleichbaren Ergebnissen wie bei den HL 60-Zellen zu führen (siehe Abb. 3.50).

4.8.4 Untersuchungen an den Kb-V1-Zellen

Das infolge der Behandlung mit den Oxazolen **26** festgestellte Aktivierungsmuster deutet auf eine Apoptoseinitiierung über den mitochondrialen Weg hin (siehe Abb. 3.51). Beim Test des Imidazols **26h** konnte bereits zu Beginn die aktive Caspase 9 registriert werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass sich die Zellen in diesem Fall nicht in einer optimalen Verfassung befanden. Da die Ergebnisse der Untersuchungen an den Kb-V1-Zellen nicht unmittelbar benötigt wurden, war die Wiederholungszahl geringer und deshalb wurden auch Bilder verwendet, deren Qualität schlechter als erwünscht war.

4.8.5 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Der Immunoblot ist eine sehr aufschlussreiche Methode, die weitergehende Erkenntnisse liefert als z.B. TUNEL- und Annexin-Test. Allerdings ist die Zahl der Proben noch stärker begrenzt, da die verwendeten Materialien teuer sind, mehr Zellen benötigt werden und der Test viel Zeit in Anspruch nimmt.

4.9 Der CAM-Assay

4.9.1 Aufzucht der Embryonen

Nur die Aufzucht der Embryonen in den mit Folie bespannten Kaffeebechern (siehe 2.12.1) verlief erfolgreich, bei keiner der alternativen Methoden (siehe 2.12.2) konnte ein ausreichendes Wachstum festgestellt werden. So war die Form der Petrischale wahrscheinlich zu weit von der des Eis entfernt (siehe 3.9.1.1). Der Inhalt des Eis verteilt sich hierbei über eine größere Fläche, was die Nährstoffversorgung beeinträchtigen und zu einem verstärkten Austrocknen führen kann. Glasschale (siehe 3.9.1.2) und Plastikbecher (siehe 3.9.1.3) nähern sich der Form des Eis besser an, aber anscheinend noch nicht weit genug, um ein Wachstum zu ermöglichen. Möglicherweise spielt hierbei auch die Flexibilität der Folie eine gewisse Rolle, die bei diesen beiden Gefäßen nicht gegeben ist. Zwar erreichte auch in den Bechern mit Folie nur ein Teil der Embryonen ein Stadium, in dem eine Untersuchung möglich ist, jedoch konnte bei allen anderen Varianten überhaupt keine Ausbildung eines verwertbaren Embryos festgestellt werden. Da der eigentliche Test erst nach Entstehung der Blutgefäße erfolgt, haben Eier, die sich nicht so weit entwickeln, aber auch keinen verfälschenden Einfluss auf das Ergebnis. Die Aufzucht in den bespannten Bechern ermöglicht auch eine problemlose und reproduzierbare Dokumentation mittels Transilluminator. Versuche, dies mit Hilfe einer Digitalkamera zu bewerkstelligen scheiterten an Spiegelungen durch das Umgebungslicht und daran, dass bei der Ablichtung keine fixe Position eingenommen werden konnte. Eine denkbare Alternative könnte jedoch ein Endoskop darstellen. Dieses könnte es auch ermöglichen, den Embryo im Ei, also in seiner natürlichen Umgebung abzulichten um so die äußeren Einflüsse zu verringern.

4.9.2 Applikation der Testsubstanzen

Die Aufbringung der Testsubstanz unter Verwendung eines Silikonrings erwies sich als zu invasiv. Höchstwahrscheinlich ist der Ring zu schwer und drückt die Blutgefäße, auf denen er ruht, ab. Rein theoretisch wäre es auch möglich, dass schädliche Stoffe, wie z.B. Weichmacher abgegeben werden, doch das ist als Ursache eher unwahrscheinlich. Auch die Applikation über ein Zellstoffplättchen ist nicht zweckmäßig. So macht sich die Testsubstanz trotz höherer Dosis in deutlich geringerem Maße und nur in unmittelbarer Nähe der Aufbringungsstelle bemerkbar. Zudem klebt das Plättchen so stark am Untergrund fest, dass ein nachträgliches Abnehmen nicht mehr möglich ist ohne dabei das Gewebe zu schädigen. Eine Betrachtung der Gefäße unter dem Plättchen ist so unmöglich. Die direkte Applikation ist am besten geeignet, um verlässliche Resultate zu erhalten. So kommt es auch bei der Behandlung mit PBS nicht zu einem Absterben wie es vorher beobachtet wurde. Einziger Nachteil ist, dass sich der Wirkstoff nicht eingrenzen lässt und sich über die gesamte Oberfläche verteilt, wodurch die Wirkung schwächer ausfällt.

4.9.3 Untersuchung der Testsubstanzen

Mit Ausnahme des rutheniumhaltigen Oxazols **26c**, des Amminooxazols **26g** und des bromierten Imidazols **26i** übten alle getesteten Oxazole **26** einen deutlich sichtbaren antivaskulären Effekt aus, der jedoch schwächer ausgeprägt war als bei der Ursprungssubstanz **7a** (siehe Abb. 3.57 bis 3.59). Der bereits beim TUNEL-Test festgestellte Unterschied in der Wirkung von **26h** und **26i** trat auch hier wieder auf (vgl. 3.6.6 und 4.6.2). Bei **26c** konnte man keinen Effekt innerhalb der ersten 24 Stunden beobachten, erst nach dreitägiger Inkubation zeigten sich abgestorbene Gefäße. Eine mögliche Erklärung wäre, dass **26c** mehr Zeit benötigt, um ans Ziel zu gelangen. Es kann aber auch sein, dass die Wirkung nicht von der Substanz selbst, sondern von einem während der Inkubation entstehenden Abbauprodukt ausgeht. Denkbar wäre eine Spaltung der Esterbindung, wobei neben dem rutheniumhaltigen Teil das antivaskulär wirksame Oxazol **26a** entstehen würde. Es wurde auch **28b** untersucht, das dem hierbei entstehenden Rutheniumaren ähnelt (siehe Abb. 3.61). **28b** hat so gut wie keine Wirkung, was nahelegt, dass allein der Oxazolteil für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Auch ein derartiges Verhalten könnte medizinisch interessant sein. Man könnte es nutzen, um die Wirkungsentfaltung zu verzögern und um so

zu verhindern, dass eine Verbindung agiert, bevor sie ihren Zielort erreicht. Allerdings könnte es auch sein, dass das wirkungslose **26c** intakt bleibt und das spätere Absterben andere, natürliche Ursachen hat. Die schwächere Wirkung der getesteten Oxazole, verglichen mit Combretastatin A-4 **7a**, muss man nicht prinzipiell negativ bewerten, da immer noch eine verbesserte Selektivität vorliegen kann. Beim CAM-Assay wird zudem die Wirkung auf reguläre Blutgefäße getestet, wünschenswert wäre jedoch eine bei tumorinduzierten. Zwar deutet eine Wirkung im CAM-Assay auf einen derartigen Effekt hin, doch sollten noch weitere Analysen wie z.B. Xenograft-Untersuchungen durchgeführt werden.^[168, 169] An dieser Stelle möchte ich auf die Veröffentlichung „4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles and -N-methylimidazoles that are cytotoxic against Combretastatin A resistant Tumor Cells and vascular disrupting in a Cisplatin resistant Germ Cell Tumor Model“ unserer Arbeitsgruppe verweisen.^[170] In diesem Artikel sind derartige Versuche mit **26h** und **26i** beschrieben, die von Dr. Thomas Müller (Abteilung „Innere Medizin IV, Onkologie/Hematologie“ der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt worden sind. Dabei zeigte sich, dass **26i** Tumorgefäße angreift. Eine Möglichkeit, den CAM-Assay zu erweitern, bestünde in der Einbringung von Tumorzellen, so dass man eine Tumorangiotenese induziert.^[171] Ergänzend könnte man auch isolierte Endothelzellen, wie z.B. HUVECs, untersuchen.^[24, 59, 172] Obwohl keine antivaskuläre Wirkung der Illudine bekannt ist, konnte bei der Untersuchung von **27k** ein starker Effekt verzeichnet werden (siehe Abb. 3.60). Da **27k** ein Diester aus Ferrocendisäure **28a** und Illudin M **11** ist, wurden auch diese beiden Stoffe untersucht (siehe Abb. 3.61). Dabei wurde von **11** auch die doppelte Menge aufgetragen, da bei einer potentiellen Esterspaltung pro Molekül **27k** zwei Moleküle **11** entstehen würden. **11** führte selbst bei der Applikation von 20 nmol zu keiner Wirkung, die der von **27k** nahekommt. Allerdings konnte ein starker Effekt bei **28a** beobachtet werden, was dafür spricht, dass dieses Strukturelement die Hauptursache für die Wirkung von **27k** darstellt. Da das rutheniumhaltige Analogon **28b** kaum wirkte, scheint das Eisen hierfür essentiell zu sein, möglicherweise liegt eine Interaktion mit dem Hämoglobin vor. Ob die Wirkung allerdings von dem Konjugat ausgeht oder den möglichen Abbauprodukten, kann anhand dieser Untersuchungen nicht gesagt werden.

4.9.4 Zusammenfassung und Problemdiskussion

Der CAM-Assay liefert interessante Resultate, allerdings gibt es einige Einschränkungen, die man bedenken sollte. So ist das Zeitfenster für Untersuchungen auf 72 h begrenzt. Bei längeren Inkubationszeiten wäre die Gefahr eines natürlichen Absterbens zu groß. Es besteht auch die Möglichkeit, dass dies früher als erwartet geschieht und man ein falsch positives Resultat erhält, weshalb Wiederholungen umso wichtiger sind. Allerdings ist die Zahl der Proben durch die begrenzte Zahl untersuchbarer Eier limitiert. Eine mögliche Fehlerquelle stellt auch der verwendete Brutschrank dar. Es handelt sich hierbei um einen umgebauten Trockenschrank, weshalb die Umgebungsbedingungen nicht ganz passend und nur unvollständig kontrollierbar waren.

4.10 Zusammenfassung

Die Ziele, die ich mir vor Beginn meiner Arbeit gesteckt habe (siehe 1.3), wurden weitestgehend erreicht. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe Illudin M **11** zuverlässig gewonnen werden kann. Die Aufzucht von *O. olearius* im Medium HA- und die Extraktion nach Kutscher-Steudel erwiesen sich hierbei als Methoden der Wahl. Illudin S **11a** konnte jedoch nicht isoliert werden.

Daneben konnte eine Reihe von Verfahren zur Evaluierung von Testsubstanzen etabliert werden. Die Untersuchungen der Substanzeigenschaften (siehe 2.5 bis 2.8) lieferten nützliche und verlässliche Ergebnisse, auch wenn man hinsichtlich des Einsatzbereiches manchmal Einschränkungen in Kauf nehmen musste. Die Stabilität von Esterbindungen wurde auf zwei Arten untersucht. Die getesteten Substanzen **16c**, **18** und **19b** erwiesen sich hierbei als weitestgehend stabil gegenüber Hydrolyse (siehe 3.2). Die Methode, die zur Untersuchung der Komplexbildung eingesetzt wurde, lässt sich nicht auf alle Verbindungen übertragen, sondern nur auf solche, deren Komplexe ein Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich besitzen (siehe 3.3). Bei den Eisenkomplexen war das Potential der getesteten Liganden, Komplexe zu bilden vergleichbar mit dem von EDTA. Bei den anderen getesteten Kationen war dieses schwächer ausgeprägt. Im Rahmen des Glutathion-Monitorings wurde festgestellt, dass – im Gegensatz zur Muttersubstanz **11** – keines der getesteten Illudinderivate **27** eine spontane Reaktion mit GSH eingeht (siehe 3.4). Der Alkylierungsassay mit Aceton liefert nur für farblose Verbindungen verlässliche Ergebnisse. Bei den getesteten Illudinderivaten **27** konnte zwar ein Alkylierungspotential gemessen werden, doch stellt deren vorhandene Eigenabsorption einen gewissen Unsicherheitsfaktor dar. Der Alkylierungsassay mit Acetophenon lieferte keine verwertbaren Ergebnisse (siehe 3.5).

Die zellbasierten Analysen (siehe 2.9 bis 2.11) sowie der CAM-Assay (siehe 2.12) sind für alle Stoffe durchführbar. Auch wenn die untersuchten Organismen (Zellen und Embryonen) nicht immer auf die gleiche Weise reagieren, kommen auch hierbei verlässliche Resultate zu Stande. Da die Zahl der durchführbaren Tests durch Kosten und Verfügbarkeit der Untersuchungsobjekte limitiert ist, wurde hinsichtlich der Testsubstanzen immer eine Vorauswahl getroffen. Beim TUNEL-Test zeigten die meisten Verbindungen ein proapoptotisches Verhalten, besonders gut wirkten die Illudinderivate **27** (siehe 3.6). Der Annexin-Test ist nur bedingt aussagekräftig. Er ließ sich zum einen nur mit Suspensionszellen

durchführen, zum anderen war es manchmal kaum möglich, spätapoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden (siehe 3.7). Mit Hilfe von Immunoblots wollte man Rückschlüsse hinsichtlich des Mechanismus der Apoptoseinitiierung ziehen. Die schnelle Prozessierung der Caspase 9 legt den Schluß nahe, dass die Platinkomplexbenutzer 13 (HL 60), die Oxazole 26 (Kb-V1), die Illudinderivate 27 (HL 60 und 518 A2) und die Chalkone 20, 21a und 21c (HL 60) zu einer Aktivierung über den mitochondrialen Weg führen. Die anderen Testverbindungen bedürfen weiterer Untersuchungen in Bezug auf den Signalweg der Apoptoseinitiierung (siehe 3.8). Einige Derivate der antivaskulären Verbindung Combretastatin A-4 7a wurden mit Hilfe des CAM-Assays untersucht. Die meisten zeigten hierbei erwartungsgemäß ein vergleichbares Verhalten. Besonders interessant ist der Aktivitätsunterschied der Combretastatin-Analoga 26h und 26i. Dieser wurde sowohl beim TUNEL-Test als auch beim CAM-Assay beobachtet, obwohl sich beide Verbindungen strukturell kaum unterscheiden.

4.11 Summary

The aims, set at the beginning of my work (1.3), have been achieved to a great extent. A procedure to obtain illudin M **11** in a reliable way was developed. For culturing of *O. olearius*, the medium HA- was used and extraction of **11** was carried out according to Kutscher-Steudel. However, it was not possible to isolate illudin S **11a**.

Furthermore, a number of procedures for compound-examination was established. The tests to evaluate the properties of the substances (2.5 to 2.8) provided useful and reliable results, even if the range of applications is limited sometimes. The stability of ester bonds was measured using two different methods. Testing substances **16c**, **18** and **19b** proved to be stable towards hydrolysis (3.2). The method used to analyze complex-formation, can only be applied to substances forming complexes that absorb in the visible part of the spectrum (3.3). When forming ferric complexes, all ligands exhibited a similar behaviour compared to EDTA. Regarding the other tested cations, the potential to form complexes was weaker. In contrast to parent compound **11**, glutathion-monitoring showed that none of the illudine-derivates **27** spontaneously reacts with GSH (3.4). The alkylation assay with acetone provided useful results, but only when colourless substances were used. For the tested illudins **27**, an alkylation potential could be determined, but the values are unreliable due to the existing intrinsic absorptions. The assay using acetophenone provided no usable results (3.5).

Cell-based examinations and the CAM-assay (2.9 to 2.11) worked with all substances. Even if the examined organisms (both cells and embryos) did not always act in the same way, the tests provided reliable and useful results. As the number of realizable tests is limited due to the costs and the availability of the specimens, the compounds, that were analyzed, have been chosen carefully. Most compounds exhibited strong pro-apoptotic properties when examined by the TUNEL-assay (3.6). Especially the illudine-derivates **27** showed remarkable activity. The annexin-assay is only of limited significance. On the one hand, it just worked with suspension cells, on the other hand, it was sometimes impossible to distinguish between late apoptotic and necrotic cells (3.7). In order to draw conclusions concerning the initiation of apoptosis, immunoblots were carried out. The fast processing of caspase 9 suggests an activation via the mitochondrial pathway due to the treatment of cells with platinum-complex-conjugates **13** (HL 60), oxazoles **26** (Kb-V1), illudines **27** (HL 60 und 518 A2) and chalkones **20**, **21a** and **21c** (HL 60). Regarding the other tested compounds a definite

Diskussion

conclusion requires further investigations concerning the way of apoptosis initiation (3.8). Some derivatives of the antivasular substance combretastatin A-4 **7a** were examined via CAM-assay. As expected most of them showed similar properties. The strong difference in activity of combretastatin-analogues **26h** and **26i** is of particular interest. It was observed in both TUNEL- and CAM-assays, although both compounds differ hardly in structure.

5. Literatur

1. R. Gross, C. G. Schmidt: Klinische Onkologie. Georg Thieme Verlag, 1985, 1.1-1.6, 2.1-2.13, 3.1-3.11, 8.1-9.12, 12.1-13.32, 16.1-18.61
2. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut, Berlin, 2010.
3. M. Greaves: Krebs – der blinde Passagier der Evolution. 1. Auflage, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 2002, 9.
4. P. U. Heitz, W. Böcker, H. Denk, H. Much: Pathologie. 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, 2008, 167-217.
5. W. Rotter: Lehrbuch der Pathologie, Band 1. 3. Auflage, F. K. Schattauer Verlag, 1985, 141-305
6. Web-link: <http://www.medizininfo.de/krebs/allgemein/tumor.shtml>, Stand: 13.10.2010
7. E.C. Borden, L. H. Baker, R. S. Bell, V. Bramwell, G. D. Demetri, B. L. Eisenberg, C. D. Fletcher, J. A. Fletcher, M. Ladanyi, P. Meltzer, B. O'Sullivan, D. R. Parkinson, P. W. Pisters, S. Saxman, S. Singer, M. Sundaram, A. T. van Oosterom, J. Verweij, J. Waalen, M. S. W. Weiss, M. F. Brennan: Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9(6)*, 1941-1956.
8. U.-F. Pape: Diagnostik und Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore aus internistischer Sicht. *Der Onkologe* **2000**, *6(7)*, 105-113.
9. B. Löwenberg, J. R. Downing, A. Burnett: Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341(14)*, 1051-1062.
10. S. L. Plasschaert, W. A. Kamps, E. Vellenga, E. G. de Vries, E. S. de Bont: Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? *Cancer Treat Rev.* **2004**, *30(1)*, 37-51.
11. K.-M. Debatin, S. Fulda: Apoptosis & Cancer Therapy, Vol. 1. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, 2006, XIX, 3-30, 282-316, 517-535
12. W. Hennig: Genetik. 2. Auflage, Springer, 1998, 72-76, 306-309, 455-468, 476-477, 494-505, 552-559, 726-728, 780.
13. R. Unterhuber: Das Wächter-Gen. *Zeit Online* **1995**, *35*, 1-4.
14. D. Hanahan, R. A. Weinberg: The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

15. W. W. Gibbs: Das Chaos in der Erbsubstanz. *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin II* **2003**, 3, 12-22.
16. D. Martin, J. S. Gutkind: Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* **2008**, 27(S2), 31-42.
17. P. Duesberg: Das Chaos in den Chromosomen. *Spektrum der Wissenschaft* **2007**, 10, 55-64.
18. D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast jr, T. S. Gansler, J. F. Holland, E. Frei III.: *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6. Auflage, B.C. Decker, Hamilton (Ontario, Kanada), 2003.
19. J. Folkman: Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am.* **1996**, 275(3), 150-154.
20. J. Randal: Antiangiogenesis drugs target specific cancers, mechanisms. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92(7), 520-522.
21. W. Fiedler, U. Gehling, T. Mende, D. K. Hossfeld: Neoangiogenese und Tumorwachstum. *Dtsch. Arztebl.* **1998**, 21, 1392-1394.
22. K.-M. Debatin, S. Fulda: *Apoptosis & Cancer Therapy*, Vol. 2. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, 2006, 777-798, 1049-1106
23. Web-link: http://www.darmkrebszentrale.de/therapie_angiogenese.html, Stand: 26.10.2010
24. H.-J. Schmoll, K. Höffken, K. Possinger: *Kompandium Internistische Onkologie*. 4. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006, 767-774.
25. E. A. Evans, D. A. Calderwood: Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* **2007**, 316, 1148-1153.
26. S. Zahler, J. Liebl, R. Fürst, A. M. Vollmar: Anti-angiogenic potential of small molecular inhibitors of cyclin dependent kinases in vitro. *Angiogenesis* **2010**, 13(3), 239-49.
27. W. Gerok, C. Huber, T. Meinertz, H. Zeidler: *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. 11. Auflage, Schattauer, Stuttgart, 2007, 1247-1249.
28. Web-link: <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/anticancerdrug/>, Stand: 17.11.2010
29. F. Nollet, P. Kools, F. van Roy: Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* **2000**, 299(3), 551-572.

30. B. Geiger, T. Volk, T. Volberg: Molecular Heterogeneity of Adherens Junctions. *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1523-1531.
31. M. Conacci-Sorrell, J. Zhurinsky, A. Ben-Ze'ev: The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*(8), 987-991.
32. R. Bäumer, A. Maiwald: Thiemes onkologische Pflege. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2008, 101.
33. A Is For... Apoptosis. *Science & Medicine* **1994**, *1*(1), 88.
34. M. Roshal, Y. Zhu, V. Planelles: Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* **2001**, *6*(1-2), 103-116.
35. S. Shimohama: Apoptosis in Alzheimer's disease - an update. *Apoptosis* **2000**, *5*(1), 9-16.
36. S. Van Cruchten, W. Van Den Broeck: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **2002**, *31*(4), 214-223.
37. D. Acehan, X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, C. W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell.* **2002**, *9*(2), 423-432.
38. A. Saraste, K. Pulkki: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45*(3), 528-537.
39. I. Ott, R. Gust: Medizinische Chemie der Platinkomplexe. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2*(35), 124-133.
40. M. Galanski, B. K. Keppler: Tumorhemmende Metallverbindungen. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2*(35), 118-123.
41. W. Voigt, A. Dietrich, H.-J. Schmoll: Cisplatin und seine Analoga. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2*(35), 134-143.
42. L. J. Boerner, J. M. Zaleski: Metal complex-DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*(2), 135-144.
43. M. J. Clarke: Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 209-233.
44. A. Tan, J. Liu, L. Chen, S. Shi, L. Ji: Synthesis, structural characteristics, DNA binding properties and cytotoxicity studies of a series of Ru(III) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*(8), 1644-1653.
45. U. Meyer: Die Geschichte der Östrogene. *Pharm. Unserer Zeit* **2004**, *33*(5), 352-356.

46. E. Aizu-Yokota, K. Ichinoseki, Y. Sato: Microtubule disruption induced by estradiol in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* **1994**, 15(9), 1875-1879.
47. K. Mohr: Pharmakologie der Estrogene. *Pharm. Unserer Zeit* **2004**, 33(5), 360-364.
48. U. Holzgrabe: Neue selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren. *Pharm. Unserer Zeit* **2004**, 33(5), 357-359.
49. G. R. Pettit, C. M. Cragg, D. L. Herald, J. M. Schmidt, P. Lohavanijaya: Antineoplastic agents. 84. Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 1374-1376.
50. G. R. Pettit, S. B. Singh, E. Hamel, C. M. Lin, D. S. Alberts, D. Garcia-Kendall: Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, 45, 209-211.
51. V. Srivastava, A. S. Negi, J. K. Kumar, M. M. Gupta, S. P. S. Khanuja: Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5892-5908.
52. Kanthou, O. Greco, A. Stratford, I. Cook, R. Knight, O. Benzakour, G. Tozer: The tubulin-binding agent combretastatin A-4-phosphate arrests endothelial cells in mitosis and induces mitotic cell death. *Am. J. Pathol.* **2004**, 165(4), 1401-1411.
53. A. Jordan, J. A. Hadfield, N. J. Lawrence, A. T. McGown: Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med. Res. Rev.* **1998**, 18(4), 259-296.
54. Kanthou, G. M. Tozer: The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* **2002**, 99(6), 2060-2069.
55. Web-link: <http://www.zytologie-online.net/zytoskelett.php>, Stand: 31.1.2011
56. A. D. Rudner, A. W. Murray: The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8(6), 773-780.
57. S. M. Nabha, R. M. Mohammad, M. H. Dandashi, B. Coupaye-Gerard, A. Aboukameel, G. R. Pettit, A. M. Al-Katib: Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8(8), 2735-2741.
58. S. M. Galbraith, D. J. Chaplin, F. Lee, M. R. Stratford, R. J. Locke, B. Vojnovic, G. M. Tozer: Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell

- morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo. *Anticancer Res.* **2001**, *21(1A)*, 93-102.
59. A. S. Rothmeier, I. Ischenko, J. Joore, D. Garczarczyk, R. Fürst, C. J. Bruns, A. M. Vollmar, S. Zahler: Investigation of the marine compound spongistatin 1 links the inhibition of PKC α translocation to nonmitotic effects of tubulin antagonism in angiogenesis. *FASEB J.* **2009**, *23(4)*, 1127-1137.
 60. S. I. Hajdu: 2000 years of chemotherapy of tumors. *Cancer* **2005**, *103(6)*, 1097-1102.
 61. D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz, H. J. Roth: Medizinische Chemie. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2005, 461-502.
 62. F. Schmaltz: Kampfstoff-Forschung im Nationalsozialismus. Zur Kooperation von Kaiser-Wilhelm-Instituten, Militär und Industrie. Band 11. Wallstein-Verlag, Göttingen, **2005**, 21.
 63. U. Meyer: Die Geschichte der Alkylanzien. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2(35)*, 104-109.
 64. U. Holzgrabe: Glufosfamid – ein neues Lost-Derivat. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2(35)*, 158-159.
 65. H. M. Arafa: Possible contribution of beta-glucosidase and caspases in the cytotoxicity of glufosfamide in colon cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *616(1-3)*, 58-63.
 66. M. Anchel, A. Herve, W. J. Robbins: Antibiotic substances from Basidiomycetes. VII. *Clitocybe illudens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1950**, *36*, 300-305.
 67. T. C. McMorris, M. Anchel: The structures of the basidiomycete metabolites illudin S and illudin M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 831-832.
 68. M. Tada, Y. Yamada, N. S. Bhacca, K. Nakanishi, M. Ohashi: Structure and reactions of illudin-S. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1964**, *12*, 853-855.
 69. A. P. W. Bradshaw, J. R. Hanson, I. H. Sadler: Studies in terpenoid biosynthesis. Part 26. Applications of ^2H and ^{13}C NMR spectroscopy to the biosynthesis of the illudin sesquiterpenoids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1982**, 2445-2448.
 70. A. Arnone, L. Merlini, G. Nasini, O. Vajna de Pava, F. Zunino: Secondary mould metabolites. Part 59. Sesquiterpene illudanes: semi-synthesis of new illudins, structures and biological activity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, *6*, 610-616.
 71. M. Kirchmair, R. Pöder, C. G. Huber: Identification of illudins in *Omphalotus nidiformis* and *Omphalotus olivascens* var. *indigo* by column liquid

- chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *832(1-2)*, 247-252.
72. A. Arnone, R. Cardillo, G. Nasini, O. V. de Pava: Secondary mould metabolites. Part 31. Isolation and structure elucidation of illudins A and B, and illudalenol, new sesquiterpenoids from *Clitocybe illudens*. *Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, *4*, 733-737.
 73. A. Arnone, R. Cardillo, V. Modugno, G. Nasin: Secondary mould metabolites. XXXIII. Structure elucidation of illudins C-E, novel illudane sesquiterpenoids isolated from *Clitocybe illudens*, using one- and two-dimensional NMR spectroscopy. *Gazz. Chim. Ital.* **1991**, *121*, 345-348.
 74. M. L. Burgess, Y. L. Zhang, K. D. Barrow: Characterization of new illudanes, illudins F, G, and H from the basidiomycete *omphalotus nidiformis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62(11)*, 1542-1544.
 75. I. K. Lee, C. Y. Jeong, S. M. Cho, B. S. Yun, Y. S. Kim, S. H. Yu, H. Koshino, I. D. Yoo: Illudins C2 and C3, new illudin C derivatives from *Coprinus atramentarius* ASI20013. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1996**, *49(8)*, 821-822.
 76. A. Gonzalez del Val, G. Platas, F. Arenal, J. C. Orihuela, M. Garcia, P. Hernández, I. Royo, N. De Pedro, L. L. Silver, K. Young, M. F. Vicente, F. Pelaez: Novel illudins from *Coprinopsis episcopalis* (syn. *Coprinus episcopalis*), and the distribution of illudin-like compounds among filamentous fungi. *Mycol. Res.* **2003**, *107(10)*, 1201-1209.
 77. A. Dufresne, K. Young, F. Pelaez, A. Gonzalez, D. Valentino, A. Graham, F. Platas, A. Bernard, D. Zink: Illudinic acid, a novel illudane sesquiterpene antibiotic. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 188-190.
 78. A. Matsuoka, A. Hirosawa, S. Natori, S. Iwasaki, T. Sofuni, M. Ishidate jr.: Mutagenicity of ptaquiloside, the carcinogen in bracken, and its related illudane-type sesquiterpenes. II. Chromosomal aberration tests with cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* **1989**, *215(2)*, 179-185.
 79. K. Yamada, M. Ojika, H. Kigoshi: Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24(4)*, 798-813.
 80. M. J. Kelner, T. C. McMorris, L. A. Estes, M. Rutherford, M. Montoya, J. Goldstein, K. Samson, R. Starr, R. Taetle: Characterization of illudin S sensitivity in DNA repair-deficient Chinese hamster cells. Unusually high sensitivity of ERCC2

- and ERCC3 DNA helicase-deficient mutants in comparison to other chemotherapeutic agents. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*(2), 403-409.
81. K. Tanaka, T. Inoue, Y. Tezuka, T. Kikuchi: Michael-type addition of illudin S, a toxic substance from *Lampteromyces japonicus*, with cysteine and cysteine-containing peptides in vitro. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1996**, *44*(2), 273-279.
 82. T. C. McMorris, M. J. Kelner, W. Wang, S. Moon, R. Taetle: On the mechanism of toxicity of illudins: the role of glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*(6), 574-579.
 83. T. C. McMorris, J. Yu, R. Lira, R. Dawe, J. R. MacDonald, S. J. Waters, L. A. Estes, M. J. Kelner: Structure-activity studies of antitumor agent irofulven (hydroxymethylacylfulvene) and analogues. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*(18), 6158-6163.
 84. K. Tanaka, T. Inoue, S. Kadota, T. Kikuchi: Metabolism of illudin S, a toxic principle of *Lampteromyces japonicus*, by rat liver. I. Isolation and identification of cyclopropane ring-cleavage metabolites. *Xenobiotica* **1990**, *20*(7), 671-681.
 85. K. Tanaka, T. Inoue, S. Kadota, T. Kikuchi: Metabolism by rat liver cytosol of illudin S, a toxic substance of *Lampteromyces japonicus*. II. Characterization of illudin S-metabolizing enzyme. *Xenobiotica* **1992**, *22*(1), 33-39.
 86. J. Gong, V. G. Vaidyanathan, X. Yu, T. W. Kensler, L. A. Peterson, S. J. Sturla: Depurinating acylfulvene-DNA adducts: characterizing cellular chemical reactions of a selective antitumor agent. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(7), 2101-2111.
 87. T. Wiltshire, J. Senft, Y. Wang, G. W. Konat, S. L. Wenger, E. Reed, W. Wang: BRCA1 contributes to cell cycle arrest and chemoresistance in response to the anticancer agent irofulven. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*(4), 1051-1060.
 88. Y. Wang, T. Wiltshire, J. Senft, E. Reed, W. Wang: Irofulven induces replication-dependent CHK2 activation related to p53 status. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*(4), 469-480.
 89. A. E. Escargueil, V. Poindessous, D. G. Soares, A. Sarasin, P. R. Cook, A. K. Larsen: Influence of irofulven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*(8), 1275-1283.
 90. K. Tanaka, S. Miyasaka, T. Inoue: Histopathological effects of illudin S, a toxic substance of poisonous mushroom, in rat. *Hum. Exp. Toxicol.* **1996**, *15*, 289-293.
 91. T. C. McMorris, M. J. Kelner, W. Wang, L. A. Estes, M. A. Montoya, R. Taetle: Structure-activity relationships of illudins: analogs with improved therapeutic index. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6876-6883.

92. T. C. McMorris, M. J. Kelner, W. Wang, J. Yu, L. A. Estes, R. Taetle: (Hydroxymethyl)acylfulvene: an illudin derivative with superior antitumor properties. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 896-899.
93. R. A. Dick, X. Yu, T. W. Kensler: NADPH alkenal/one oxidoreductase activity determines sensitivity of cancer cells to the chemotherapeutic alkylating agent irofulven. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*(4), 1492-1499.
94. R. A. Dick, T. W. Kensler: The catalytic and kinetic mechanisms of NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(17), 17269-17277.
95. R. J. Schilder, J. A. Blessing, M. S. Shahin, D. S. Miller, K. S. Tewari, C. Y. Muller, D. P. Warshal, S. McMeekin, J. Rotmensch: A phase 2 evaluation of irofulven as second-line treatment of recurrent or persistent intermediately platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group trial. *Int. J. Gynecol. Cancer.* **2010**, *20*(7), 1137-1141.
96. B. Biersack: Naturstoff-basierte Cytostatika mit verbesserter Tumorselektivität und Potential zur Überwindung von Wirkstoffresistenzen. Dissertation, Universität Bayreuth, **2009**
97. R. Schobert, B. Biersack: cis-Dichloroplatinum (II) complexes with aminomethylnicotinate and isonicotinate ligands. *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 3369-3376.
98. R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, A. Grotemeier, T. Müller, B. Kalinowski, S. Knauer, W. Voigt, R. Paschke: Monoterpenes as drug shuttles: cytotoxic (6-aminomethylnicotinate)dichloridoplatinum(II) complexes with potential to overcome cisplatin resistance. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*(6), 1288-1293.
99. G. Bernhardt, B. Biersack, S. Bollwein, R. Schobert, M. Zoldakova: Terpene conjugates of diaminedichloridoplatinum(II) complexes: antiproliferative effects in HL-60 leukemia, 518A2 melanoma, and HT-29 colon cancer cells. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*(8), 1645-1659.
100. R. Schobert, G. Bernhardt, B. Biersack, S. Bollwein, M. Fallahi, A. Grotemeier, G. L. Hammond: Steroid conjugates of dichloro(6-aminomethylnicotinate)platinum(II): effects on DNA, sex hormone binding globulin, the estrogen receptor, and various breast cancer cell lines. *ChemMedChem.* **2007**, *2*(3), 333-342.

101. B. Biersack, R. Schobert: Metallodrug Conjugates with Steroids and Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM). *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16(18)*, 2324-2337.
102. R. Schobert R, S. Seibt, K. Effenberger-Neidnicht, C. Underhill, B Biersack, G. L. Hammond: (Arene)Cl₂Ru(II) complexes with N-coordinated estrogen and androgen isonicotinates: interaction with sex hormone binding globulin and anticancer activity. *Steroids* **2011**, *76(4)*, 393-399.
103. R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, S. Knauer, M. Zoldakova, A. Fruehauf, T. Mueller: Pt(II) complexes of a combretastatin A-4 analogous chalcone: effects of conjugation on cytotoxicity, tumor specificity, and long-term tumor growth suppression. *J. Med. Chem.* **2009**, *52(2)*, 241-246.
104. M. Zoldakova, Z. Kornyei, A. Brown, B. Biersack, E. Madarász, R. Schobert: Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its Pt-complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80(10)*, 1487-1496.
105. B. Biersack, K. Effenberger, R. Schobert, M. Ocker: Oxazole-bridged combretastatin A analogues with improved anticancer properties. *ChemMedChem* **2010**, *5(3)*, 420-427.
106. B. Biersack, K. Effenberger, S. Knauer, M. Ocker, R. Schobert R: Ru(η^6 -arene) complexes of combretastatin-analogous oxazoles with enhanced anti-tumoral impact. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45(11)*, 4890-1896.
107. R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, K. Effenberger, S. Knauer, T. Mueller: 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles and -N-methylimidazoles that are cytotoxic against combretastatin A resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J. Med. Chem.* **2010**, *53(18)*, 6595-6602.
108. R. Schobert, K. Effenberger-Neidnicht, B. Biersack: Stable combretastatin A-4 analogues with sub-nanomolar efficacy against chemoresistant HT-29 cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *49(1)*, 71-72.
109. R. Schobert, B. Biersack, S. Knauer, M. Ocker: Conjugates of the fungal cytotoxin illudin M with improved tumour specificity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16(18)*, 8592-8597.
110. S. Knauer, B. Biersack, M. Zoldakova, K. Effenberger, W. Milius, R. Schobert: Melanoma-specific ferrocene esters of the fungal cytotoxin illudin M. *Anticancer Drugs* **2009**, *20(8)*, 676-681.

111. Persönliche Mitteilung durch Dipl.-Chem. S. Seibt, Universität Bayreuth.
112. B. Biersack, R. Diestel, C. Jagusch, F. Sasse, R. Schobert: Metal complexes of natural melophlins and their cytotoxic and antibiotic activities. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103(1)*, 72-76.
113. R. E. Diestel: Biologische Charakterisierung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten unter besonderer Berücksichtigung von High-Content Analysemethoden. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, **2010**.
114. S. Breyer, K. Effenberger-Neidnicht, S. Knauer, R. Schobert: Synthesis, anticancer activity, and iron affinity of the Actinoplanes metabolite 7,8-dihydroxy-1-methylnaphtho[2,3-c]furan-4,9-dione. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19(3)*, 1264-1267.
115. T. Mosmann: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
116. T. G. McCloud, P. A. Klueh, K. C. Pearl, L. K. Cartner, G. M. Muschik, K. K. Poole: Isolation of Illudin S from the mature Basidiocarp of *Omphalotus illudens*, and Isolation of Illudin S and M from the Fermentation Broth of *Omphalotus olearis*. *Presented at the American Society of Pharmacognosy - 37th Annual Meeting - July 27-31 1996, Santa Cruz, CA*
117. T. C. McMorris, M. Anchel: Fungal Metabolites. The Structures of the novel sesquiterpenoids Illudin-S and -M. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1594-1600.
118. T. C. McMorris: Discovery and Development of Sesquiterpenoid derived Hydroxymethylacylfulvene: A new anticancer drug. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 881-886.
119. W. J. Robbins, F. Kavanagh, A. Hervey: Antibiotic Substances from Basidiomycetes: I. *Pleurotus griseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1947**, *33(6)*, 171-176.
120. A. Mayer: Bekämpfung von pflanzenparasitären Nematoden der Gattung *Meloidogyne* mit Pilzen und deren Toxinen. Dissertation, Universität Kaiserslautern, **1995**.
121. DSMZ: 90. Malt Extract Agar, 2007, DSMZ GmbH
122. S. Eckhardt, W. Gottwald, B. Stieglitz: 1x1 der Laborpraxis. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 277-278.
123. M. C. Venier-Julienne, J. P. Benoît: Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharm. Acta Helv.* **1996**, *71(2)*, 121-128.

124. G. F. Kaufmann, R. Sartorio, S.-H. Lee, C. J. Rogers, M. M. Meijler, J. A. Moss, B. Clapham, A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda: Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *PNAS* **2005**, 102(2), 309–314.
125. U. R. Kunze, G. Schwedt: Grundlagen der qualitativen und quantitativen Analyse. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996, 177.
126. J. Wang, J. L. Buss, G. Chen, P. Ponka, K. Pantopoulos: The prolyl 4-hydroxylase inhibitor ethyl-3,4-dihydroxybenzoate generates effective iron deficiency in cultured cells. *FEBS Lett.* **2002**, 529, 309-312.
127. H. J. C. F. Nelis, S. C. Airy, J. E. Sinsheimer: Comparison of the Alkylation of Nicotinamide an 4-(p-Nitrobenzyl)pyridine for the Determination of Aliphatic Epoxides. *Anal. Chem.* **1982**, 54, 213-216.
128. J. W. Huff: The Fluorescent Condensation Product of N¹-Methylnicotinamide and Acetone. *J. Biol. Chem.* **1947**, 167, 151-156.
129. H. J. C. F. Nelis, J. E. Sinsheimer: A Sensitive Fluorimetric Procedure for the Determination of Aliphatic Epoxides under Physiological Conditions. *Anal. Biochem.* **1981**, 115, 151-157.
130. S. J. Collins, R. C. Gallo, R. E. Gallagher: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **1977**, 270, 347–349.
131. B. Jansen, H. Schlagbauer-Wadl, H.-G. Eichler, K. Wolff, A. van Elsas, P. Schrier, H. Pehamberger: Activated N-ras contributes to the chemoresistance of human melanoma in severe combined immunodeficiency (SCID) mice by blocking apoptosis. *Cancer Res.* **1997**, 57, 362–365.
132. S. Akiyama, A. Fojo, J. A. Hanover, I. Pastan, M. M. Gottesman: Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somat. Cell Mol. Genet.* **1985**, 11(2), 117-126.
133. D. W. Shen, C. Cardarelli, J. Hwang, M. Cornwell, N. Richert, S. Ishii, I. Pastan, M. M. Gottesman: Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261(17), 7762-7770.
134. S. C. Brooks, E. R. Locke, H. D. Soule: Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* 1973, 248(17), 6251-6253.

135. K. B. Horwitz, M. E. Costlow, W. L. McGuire: MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* 1975, 26(6), 785-795.
136. S. von Kleist, E. Chany, P. Burtin, M. King, J. Fogh: Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, 55(3), 555-560.
137. T. Lindl: Zell- und Gewebekultur. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2000.
138. J. Fogh: Tumor Cell Lines in Vitro, Plenum Press, New York, 1975, 115-159.
139. R. I. Freshney: Tierische Zellkulturen. 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1990
140. Web-link: <http://de.wikipedia.org/wiki/Neubauer-Z%C3%A4hlkammer>, Stand: 4.4.2011
141. Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* **1992**, 119(3), 493-501.
142. R. Sgonc, G. Boeck, H. Dietrich, J. Gruber, H. Recheis, G. Wick: Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.* **1994**, 10(2), 41-42.
143. Roche: In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein. Instruction Manual, Version November 2004
144. M. Jobmann: Apoptose bei strukturellen Herzmuskelerkrankungen. Dissertation, Universität Marburg, **2002**
145. E. Vellenga, L. Tuyt L, B. J. Wierenga, M. Müller M, W. Dokter: Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 127(2), 441-448.
146. M. Labelle, M. Belley, Y. Gareau, J. Y. Gauthier, D. Guay, R. Gordon, S. G. Grossman, T. R. Jones, Y. Leblanc, M. McAuliffe, C. McFarlane, P. Masson, K. M. Metters, N. Ouimet, D. H. Patrick, H. Piechuta, C. Rochette, N. Sawyer, Y. B. Xiang, C. B. Pickett, A. W. Ford-Hutchinson, R. J. Zamboni, R. N. Young: Discovery of MK-0476, a potent and orally active leukotriene D₄ receptor antagonist devoid of peroxisomal enzyme induction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5(3), 283-288.

147. Roche: Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Instruction Manual, Version May 2005
148. S. D. Monahan, V. M. Subbotin, V. G. Budker, P. M. Slattum, Z. C. Neal, H. Herweijer, J. A. Wolff: Rapidly reversible hydrophobization: an approach to high first-pass drug extraction. *Chem. Biol.* **2007**, *14*(9), 1065-1077.
149. H. A. M. Andree, C. P. M. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H. C. Hemker, W. T. Hermens, G. M. Willems: Binding of Vascular Anticoagulant a (VACa) to Planar Phospholipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*(9), 4923-4928.
150. A. S. Grotebauer: Bioevaluation und Wirkmechanismen neuer Pt(II)-Komplex-Konjugate. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, **2006**
151. J. C. Lai, L. Benimetskaya, A. Khvorova, S. Wu, E. Hua, P. Miller, C. A. Stein: Phosphorothioate oligodeoxynucleotides and G3139 induce apoptosis in 518A2 melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*(2), 305-315.
152. Nunc: Cell Adhesion and Growth on coated or modified Glass or plastic surfaces. Nunc Bulletin Nr. 13
153. S. Wagner, C. Hafner, D. Allwardt, J. Jasinska, S. Ferrone, C. C. Zielinski, O. Scheiner, U. Wiedermann, H. Pehamberger, H. Breitender: Vaccination with a Human High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen Mimotope Induces a Humoral Response Inhibiting Melanoma Cell Growth In Vitro. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 976-982.
154. M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
155. Sigma: Bradford Reagent for Protein Determination, Product Information, Version Juli 1998
156. U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
157. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*(9), 4350-4354.
158. Roth: Gebrauchsanweisung Tank Blot Mini & Maxi, Version 4/2004
159. R. Westermeier, S. Gronau, H. Schickle: Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. Sonderdruck RE-072, Pharmacia, Freiburg, 1988.
160. T. Müller: Untersuchungen zur Chemotherapie-Resistenz des malignen testikulären Keimzelltumors. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2005**.

161. H. O. Fearnhead, J. Rodriguez, E.-E. Govek, W. Guo, R. Kobayashi, G. Hannon, Y. A. Lazebnik: Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 13664-13669.
162. J. Folkman: Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci. Am.* **1996**, 275(3), 150-154.
163. J. Wilting, B. Christ, M. Bokeloh: A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF. *Anat. Embryol.* **1991**, 183, 259-271.
164. J. Rodrigues, C. Abramjuk, L. Vásquez, N. Gamboa, J. Domínguez, B. Nitzsche, M. Höpfner, R. Georgieva, H. Bäumlér, C. Stephan, K. Jung, M. Lein, A. Rabien: New 4-maleamic Acid and 4-maleamide peptidyl chalcones as potential multitarget drugs for human prostate cancer. *Pharm. Res.* **2011**, 28(4), 907-919.
165. J. D. Dugan jr., M. T. Lawton, B. Glaser, H. Brem: A New Technique for Explantation and In Vitro Cultivation of Chicken Embryos. *Anat. Rec.* **1991**, 229, 125-128.
166. C. J. Fisher: Chick Embryos in Shell-less Culture. *Tested studies for laboratory teaching* **1993**, 5, 105-115.
167. S. Datar, R. R. Bhonde: Shell-less chick embryo culture as an alternative in vitro model to investigate glucose-induced malformations in mammalian embryos. *Rev. Diabetic Stud.* **2005**, 2, 221-227.
168. C. L. Morton, P. J. Houghton: Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* **2007**, 2(2), 247-250.
169. A. Richmond, Y. Su: Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis. Model. Mech.* **2008**, 1, 78-82.
170. R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, K. Effenberger, S. Knauer, T. Mueller: 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles and -N-methylimidazoles that are cytotoxic against combretastatin a resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J. Med. Chem.* **2010**, 53(18), 6595-6602.
171. Persönliche Mitteilung durch Dr. M. Höpfner, Charité Berlin.
172. J. Liebl, S. B. Weitensteiner, G. Vereb, L. Takács, R. Fürst, A. M. Vollmar, S. Zahler: Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285(46), 35932-35943.

6. Publikationsliste

- R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, A. Grotemeier, T. Müller, B. Kalinowski, S. Knauer, W. Voigt, R. Paschke: Monoterpenes as drug shuttles: cytotoxic (6-aminomethylnicotinate)dichloridoplatinum(II) complexes with potential to overcome cisplatin resistance. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(6), 1288-1293.
- R. Schobert, B. Biersack, S. Knauer, M. Ocker: Conjugates of the fungal cytotoxin illudin M with improved tumour specificity. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16(18), 8592-8597.
- R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, S. Knauer, M. Zoldakova, A. Fruehauf, T. Mueller: Pt(II) complexes of a combretastatin A-4 analogous chalcone: effects of conjugation on cytotoxicity, tumor specificity, and long-term tumor growth suppression. *J. Med. Chem.* **2009**, 52(2), 241-246.
- S. Knauer, B. Biersack, M. Zoldakova, K. Effenberger, W. Milius, R. Schobert: Melanoma-specific ferrocene esters of the fungal cytotoxin illudin M. *Anticancer Drugs* **2009**, 20(8), 676-681.
- B. Biersack, K. Effenberger, S. Knauer, M. Ocker, R. Schobert: Ru(η^6 -arene) complexes of combretastatin-analogous oxazoles with enhanced anti-tumoral impact. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45(11), 4890-4896.
- R. Schobert, B. Biersack, A. Dietrich, K. Effenberger, S. Knauer, T. Mueller: 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles and -N-methylimidazoles that are cytotoxic against combretastatin A resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J. Med. Chem.* **2010**, 53(18), 6595-6602.
- R. Schobert, S. Knauer, S. Seibt, B. Biersack: Anticancer active illudins: recent developments of a potent alkylating compound class. *Curr. Med. Chem.* **2011**, 18(6), 790-807.
- S. Breyer, K. Effenberger-Neidnicht, S. Knauer, R. Schobert: Synthesis, anticancer activity, and iron affinity of the Actinoplanes metabolite 7,8-dihydroxy-1-methylnaphtho[2,3-c]furan-4,9-dione. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19(3), 1264-1267.

Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Rainer Schobert danken, sowohl für die Überlassung dieses sehr ergiebigen Themas, als auch dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Dank gilt auch allen meinen Kollegen, die für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Hervorheben möchte ich hierbei vor allem meine Laborkolleginnen Dipl.-Biochem. Antje Grotemeier, Dr. Miroslava Žoldáková, Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht, M.Sc. Katharina Mahal und M.Sc. Julienne Münzner, ohne die ich nicht soweit gekommen wäre. Besonderer Dank gilt auch Dr. Bernhard Biersack, und Dipl.-Chem. Sebastian Seibt, die die von mir untersuchten Verbindungen zur Verfügung gestellt und sich meiner angenommen haben, wann immer ich Fragen auf chemischem Gebiet hatte sowie Dr. Ralf Stehle. Danken möchte ich auch Kerstin Hannemann und Michael Glässner, die die NMR- bzw. MS-Analysen durchgeführt haben.

Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann, Prof. Dr. Olaf Stemmann und dem Lehrstuhl für Genetik danke ich dafür, dass ich dort die Auswertung der Immunoblots vornehmen und ihre Geräte dafür benutzen durfte.

Dankend erwähnen möchte ich auch meine Praktikanten und Bachelors, die eine große Hilfe für mich darstellten: Simon Anthofer, Corinna Bayreuther, Ines Brandherm, Karin Broll, Stephanie Bruchner, Christian Butterhof, Elena Doblhofer, Fabian Eber, Dr. Katharina Effenberger-Neidnicht, Katharina Finger, Matthias Feuerbach, Josef Hausner, Marcel Jurk, Florian Kirchmann, Katja Kochrube, Romy Männel, Manuela May, Lars Müller, Annika Pfeiffer, Susanne Ruch, Thomas Ruhland, Karin Tradt, Katja von Nessen, Juliane Wagener, Sinja Wendel, Christina Werhahn, Sandra Wetzels, Bettina Zierer und besonders Alexandra Heichwald, die eigenes Wissen bei der Entwicklung des CAM-Assays mit eingebracht hat.

Dem Robert-Koch-Institut und der Firma Roth möchte dafür danken, dass sie mir die Verwendung ihrer Abbildungen gestattet haben.

Finanziell unterstützt wurde meine Arbeit durch die DFG im Rahmen der Projekte Scho 402/8-1 (Konjugate von Diaminoplatinkomplexen mit Spirocyclopropanalkylantien - Wechselwirkungen mit DNA und Proteinen) und Scho 402/8-2 (Konjugate von Diaminoplatinkomplexen – Wechselwirkungen mit DNA und Proteinen) sowie durch Studiengebühren.

Zuletzt möchte ich auch meine Familie erwähnen, besonders meine Mutter und meine Freundin, die mich immer unterstützt und mir Geduld entgegengebracht haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Eckersdorf, den 5.12.2011

(Sebastian Knauer)